



SKRIPSI

**ISOLASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DAN  
UJI ANTIOKSIDAN DARI RANTING *Garcinia  
balica***

UCHIK NUR HIDAYATIKA  
NRP 1411 100 069

Dosen Pembimbing  
Prof. Dr. Taslim Ersam, M.S.

**JURUSAN KIMIA**  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
SURABAYA  
2015



SCRIPT

**ISOLATION                  SECONDARY                  METABOLITE  
COMPOUND      AND      ANTIOXIDANT      TEST      FROM  
THE BRANCH OF *Garcinia balica***

UCHIK NUR HIDAYATIKA  
NRP 1411 100 069

**Advisor Lecture**  
Prof. Dr. Taslim Ersam, M.S.

CHEMISTRY DEPARTMENT  
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES  
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
SURABAYA  
2015

## KATA PENGANTAR

*Alhamdulillahirobbil'alamin*. Segala puji senantiasa dipanjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga naskah Tugas Akhir berjudul **“ISOLASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DAN UJI ANTIOKSIDAN DARI RANTING *Garcinia balica*”** dapat diselesaikan dengan baik. Tugas Akhir ini dapat diselesaikan atas bantuan dan dukungan dari semua pihak. Oleh karena itu penulis sangat berterima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Taslim Ersam, M. S, selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses pengerjaan Tugas Akhir.
2. Hamzah Fansuri, M.Si, Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia atas fasilitas yang telah diberikan hingga naskah Tugas Akhir ini dapat terselesaikan.
3. Drs. M. Nadjib M, M.S, selaku dosen wali atas pengarahannya dan motivasinya.
4. Seluruh dosen, karyawan KIMIA FMIPA ITS, yang membantu dan memberikan semangat dalam pengerjaan Tugas Akhir.
5. Semua pihak yang terkait atas bantuan dan dukungannya.

Penulis menyadari bahwa penulisan naskah Tugas Akhir ini masih terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis terbuka terhadap kritik dan saran yang membangun. Semoga Tugas Akhir ini memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca.

Surabaya, 12 Januari 2015

Penulis

**LEMBAR PENGESAHAN**

**ISOLASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DAN UJI  
ANTIOKSIDAN DARI RANTING *Garcinia balica***

**SKRIPSI**

Disusun oleh :

**UCHIK NUR HIDAYATIKA**

**NRP. 1411100069**

Surabaya, 12 Januari 2015

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing,

Prof. Dr. Taslim Ersam, M. S.  
NIP. 195208 16197903 1 004

Mengetahui :  
Ketua Jurusan Kimia,

Hamzah Fansuri, M. Si, Ph.D  
NIP. 19691017 199412 1 001

## **ISOLASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DAN UJI ANTIOKSIDAN DARI RANTING *Garcinia balica***

**Nama Mahasiswa** : Uchik Nur Hidayatika  
**NRP** : 1411100069  
**Jurusan** : Kimia FMIPA-ITS  
**Pembimbing** : Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.  
**Abstrak**

Senyawa 2,2,3,5,5-pentametil-1-pentanol (**1**) telah berhasil diisolasi dari ekstrak metanol ranting *Garcinia balica* asal Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur berbentuk pasta oil tak berwarna dengan titik leleh 67°C - 68°C. Metode isolasi menggunakan Kromatografi Cair Vacum (KCV) dielusi dengan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Penentuan struktur menggunakan hasil teknik NMR-1D dan NMR 2-D serta spektrofotometer IR. Aktivitas antioksidan ditentukan menggunakan metode uji DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Senyawa **1** menunjukkan mL tidak aktif terhadap pengujian DPPH sedangkan Fraksi C menunjukkan penghambatan dengan nilai IC<sub>50</sub> 86,50 µg/mL namun aktivitas penghambatan masih dibawah trolox sebagai kontrol positif

**Kata kunci** : *Garcinia balica*, Clusiaceae, senyawa metabolit sekunder, aktivitas antioksidan, DPPH.

**ISOLATION SECONDARY METABOLITE COMPOUND  
AND ANTIOXIDANT TEST FROM THE BRANCH OF  
*Garcinia balica***

**Student Nam** : Uchik Nur Hidayatika  
**Student Identity Number** : 1411100069  
**Department** : Chemistry FMIPA-ITS  
**Advicor Lecture** : Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.  
**Abstrac**

2,2,3,5,5-pentametil-1-pentanol (**1**) was isolated from crude methanol extract of the branch of *Garcinia balica* from Baluran National Park, Situbondo, Jawa Timur as colourless pasta oil with melting point 67°C - 68°C. Isolation method used vacuum liquid chromatography eluted with increasing polarity solvent and preparative thin layer chromatography. Its structure was elucidated using 1D and 2D NMR techniques along with IR spectrophotometry. The antioxidant activity was determined using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. Compound **1** menunjukkan showed negative antioxidant activity. Fraction of C showed inhibition on DPPH with IC<sub>50</sub> value 86,50 µg/m but inhibition activity is lower than trolox as a positive control.

**Keywords** : *Garcinia balica*, Clusiaceae, metabolite secondary compound, antioxidant activity, DPPH.

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
Abstrak .....	iii
Abstract .....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi

## BAB I PENDAHULUAN

1.1	Latar Belakang.....	1
1.2	Perumusan masalah .....	3
1.3	Tujuan Penelitian.....	3
1.4	Manfaat Penelitian.....	3

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1	Taksonomi <i>Garcinia</i> .....	5
2.2	Senyawa metabolit Sekunder dari <i>Garcinia</i> .....	5
2.3	Metode Isolasi dan pemurnian senyawa.....	8
2.3.1	Ekstraksi .....	8
2.3.2	Fraksinasi.....	9
2.3.3	Rekristalisasi.....	12
2.3.4	Uji titik leleh.....	12
2.4	Tinjauan spektroskopi senyawa.....	13

2.5	Tinjauan Radikal Bebas dan Antioksidan .....	16
2.6	Metode pengujian aktivitas antioksidan .....	19

### BAB III METODOLOGI PERCOBAAN

3.1	Alat dan Bahan .....	23
3.1.1	Alat .....	23
3.1.2	Bahan .....	23
3.2	Prosedur penelitian .....	23
3.2.1	Persiapan sampel dan Uji Pendahuluan sampel .....	23
3.2.2	Ekstraksi .....	24
3.2.3	Fraksinasi Ekstrak Pekat Metanol .....	24
3.2.4	Uji Kemurnian Senyawa .....	25
3.2.5	Identifikasi Struktur Senyawa .....	26
3.2.6	Uji Antioksidan .....	26

### BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Uji Pendahuluan Sampel .....	29
4.2	Ekstraksi .....	29
4.3	Fraksinasi Ekstrak Pekat Metanol .....	30
4.4	Uji Kemurnian Senyawa .....	33
4.5	Penentuan struktur Senyawa 1 .....	34
4.6	Uji Antioksidan .....	39

### BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan .....	45
-----	------------------	----



5.2	Saran .....	45
	DAFTAR PUSTAKA.....	47
	LAMPIRAN .....	51
	BIODATA PENULIS.....	60

## DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Data pergeseran kimia $\delta_H$ spektrum $^1H$ NMR, $\delta_C$ spektrum $^{13}C$ NMR, dan DEPT 135 pada senyawa 1..	36
Tabel 4. 2 Data korelasi HMBC pada senyawa 1 .....	38
Tabel 4. 3 Hasil Uji aktivitas antioksidan.....	41

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1	Perkiraan serapan inframerah beberapa gugus fungsi .....	14
Gambar 2. 2.	Pergeseran kimia untuk beberapa jenis proton .....	16
Gambar 2. 3	Pergeseran kimia untuk beberapa jenis karbon .....	16
Gambar 2. 4	Reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh antioksidan.....	20
Gambar 2. 5	Struktur senyawa Trolox .....	21
Gambar 4. 1	Kromatogram hasil KCV pertama yang dielusi dengan metanol : kloroform 5% .....	30
Gambar 4. 2	Kromatogram fraksi gabungan KCV pertama yang dielusi dengan metanol : kloroform 5% .....	31
Gambar 4. 3	Kromatogram fraksi gabungan KCV kedua yang dielusi dengan metanol : kloroform 2% .....	31
Gambar 4. 4	Hasil Uji tiga eluen pada senyawa 1.....	33
Gambar 4. 5	Hasil Uji KLT 2D pada senyawa 1.....	34
Gambar 4. 6	Hasil spektrum IR senyawa 1 dalam KBr .....	35
Gambar 4. 7	Korelasi HMBC pada senyawa 1.....	38
Gambar 4. 8	Struktur senyawa 2,2,4,5,5-pentametil-1-pentanol.	38
Gambar 4. 9	Aktivitas DPPH dari trolox, fraksi A, C, B2.8, B2.G.A, dan senyawa <b>1</b> . ....	40
Gambar 4. 10	Aktivitas Penghambatan DPPH dari Trolox.....	42
Gambar 4. 11	Aktivitas Penghambatan DPPH dari Fraksi C.....	42

## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN A SKEMA KERJA.....	51
LAMPIRAN B SPEKTRUM $^1\text{H}$ -NMR SENYAWA 1.....	56
LAMPIRAN C SPEKTRUM $^{13}\text{C}$ -NMR SENYAWA 1.....	57
LAMPIRAN D SPEKTRUM HMBC SENYAWA 1 .....	58
LAMPIRAN E HASIL IDENTIFIKASI TUMBUHAN.....	59

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Letak astronomis Indonesia berada pada 6°LU - 11°LS dan 95°BT - 141°BT yang artinya Indonesia berada di daerah iklim tropis serta terdapat diantara 23,5°LU dan 23,5°LS. Hal ini mengakibatkan Indonesia memiliki temperatur udara cukup tinggi, yaitu 26° C - 28°C, curah hujan cukup tinggi, yaitu 700 - 7.000 mm/tahun. Wilayah Indonesia yang dilalui garis katulistiwa membuat wilayah ini mendapat paparan sinar matahari sepanjang tahunnya. Akibatnya beberapa penyakit tropis yang ditimbulkan dari reaksi oksidasi seperti penyakit kanker, diabetes, kelainan imunitas dan penuaan dini. Permasalahan ini dapat diatasi dengan penggunaan senyawa antioksidan yang semakin berkembang baik untuk makanan maupun pengobatan seiring berkembangnya tentang radikal bebas. Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibagi menjadi antioksidan alami dan antioksidan sintetis atau buatan. Antioksidan sintetis ini memiliki efek samping yang berbahaya bagi kesehatan manusia karena bersifat karsinogenik sehingga pemanfaatan bahan alam yang mempunyai aktivitas biologis sebagai antioksidan menjadi alternatif dan mulai dilakukan penelitian lebih lanjut. Hal ini didukung dengan kekayaan sumber daya alam yang dimiliki wilayah Indonesia.

Proses pelapukan batuan yang cukup cepat berdampak pada tanah yang subur untuk tumbuhnya beragam spesies flora dan fauna. Hal ini dibuktikan dari sekitar 54% dari seluruh spesies tumbuhan di dunia terdapat di hutan tropis Indonesia, dimana sekitar 250.000 spesies merupakan tumbuhan tingkat tinggi (Ersam, 2001). Tumbuhan hutan tropis berperan sebagai sumber daya hayati dan sumber senyawa kimia berupa hasil metabolit primer maupun metabolit sekunder. Senyawa hasil metabolit sekunder pada tumbuhan sangat beragam dan beberapa kelompok senyawa bahan alam diantaranya terpenoid, steroid,

alkaloid, dan flavonoid yang berfungsi untuk mempertahankan diri dari serangan musuh ataupun beradaptasi dengan lingkungan.

Tumbuhan tropis tersebut salah satunya berasal dari *Garcinia* yaitu genus terbesar dalam famili Clusiaceae. Penelitian kandungan kimia secara sistematis telah dilakukan terhadap spesies Clusiaceae khususnya dari genus *Garcinia* seperti *Garcinia balica*. *G. balica* adalah tumbuhan endemik yang mulai dilestarikan dan berada di Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur. Tumbuhan ini memiliki nama daerah munda alas. Secara tradisional tumbuhan ini sering digunakan sebagai obat kulit, antibengkak, antimalaria dan antihipertensi (Sari dan Hanan, 2009). Hal ini membuktikan bahwa tumbuhan *G. balica* mengandung senyawa metabolit sekunder aktif sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder karena tumbuhan ini belum banyak dijadikan objek penelitian.

Hasil penelitian terhadap *G. balica* yang pernah dilaporkan adalah isolasi turunan 4 fenilkumarin yaitu 5,7-dihidroksi-8-(1,2-dihidroksi-3-metilbutenil-3)-4fenilkumarin dari ekstrak etil asetat pada bagian batang yang memiliki aktivitas tinggi sebagai antioksidan, begitu pula ditemukannya senyawa 5-hidroksi 4-fenilkumarin dan 7-hidroksi 4-fenilkumarin. Untuk melengkapi data afinitas kimia pada spesies ini maka dilakukan penelitian terhadap ranting *G. balica*. Hal ini berkaitan dengan teori kekerabatan diantara tumbuhan yang merupakan dasar hipotesis pada penelitian ini yaitu tumbuhan dalam satu genus atau famili memiliki afinitas kimia sama secara kualitatif dan berbeda secara kuantitatif. Bagian-bagian tertentu pada bagian tumbuhan juga berpeluang menemukan senyawa yang sama atau berbeda. Perbedaan ekosistem tumbuhan akan mempengaruhi senyawa yang dihasilkan (Venkataraman, 1976). Oleh sebab itu, dengan ditemukannya beberapa senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologi tertentu, maka diharapkan dalam penelitian ini dapat diungkapkan sifat bioaktif senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari *G. Balica*. Uji bioaktivitas yang

digunakan adalah uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

### **1.2 Perumusan masalah**

Permasalahan pada penelitian ini adalah apakah ditemukan senyawa metabolit sekunder dari ranting *G. balica* yang berasal dari taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur dan apakah senyawa tersebut bersifat bioaktif melalui uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari ranting *G. balica* dan mengetahui aktivitas antioksidan melalui metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian memberikan informasi ilmiah berupa senyawa metabolit sekunder dari ranting *G. balica* asal taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur dan bioaktivitasnya melalui uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Taksonomi *Garcinia***

Famili Clusiaceae adalah salah satu jenis tumbuhan tingkat tinggi dan banyak dijumpai di daerah iklim tropis yang meliputi 40 marga dan 1000 spesies. Genus *Garcinia* dari famili Clusiaceae banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai obat tradisional untuk penyakit disentri, radang amandel, pereda nyeri dan obat malaria. Salah satu spesies dari *Garcinia* adalah *G. balica* atau biasa disebut mundu alas merupakan tumbuhan yang tumbuh di wilayah hutan tropis. Spesies yang termasuk dalam genus *Garcinia* ini memiliki ciri khas yaitu tinggi sekitar 20 meter, daun lebar berbentuk *elips* dengan besar 14 cm x 7 cm dan memiliki bunga berkopak luar berwarna merah dan kelopak dalamnya berwarna kuning serta kulit buah berwarna merah. Adapun taksonomi spesies ini sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermathophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dycotyledoneae
Subkelas	: Archichlamydaea
Ordo	: Parietales
Famili	: Clusiaceae
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia balica</i>
Nama Daerah	: Mundu alas

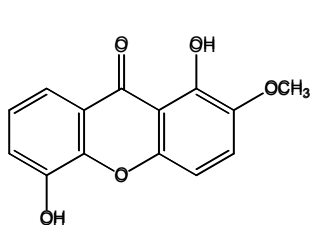
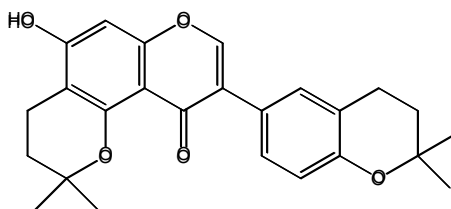
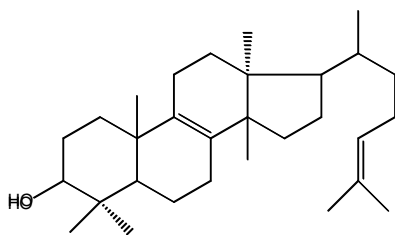
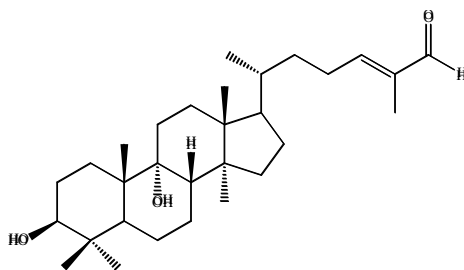
(Sari dan Hanan, 2009)

#### **2.2 Senyawa metabolit Sekunder dari *Garcinia***

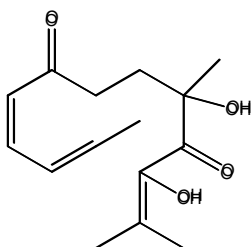
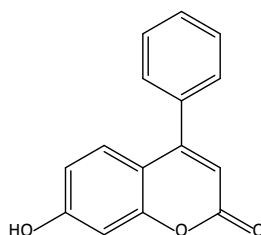
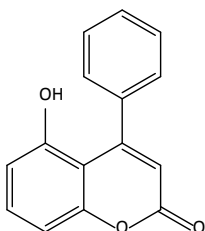
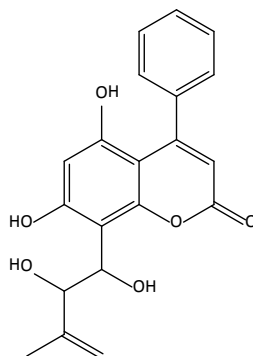
Tumbuhan yang hidup di daerah tropis umumnya berperan sebagai sumber senyawa kimia berupa senyawa hasil metabolit primer maupun metabolit sekunder. Senyawa metabolit primer seperti protein, karbohidrat, lemak, asam nukleat, dan

polisakarida untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Sedangkan senyawa metabolit sekunder diantaranya terpenoid, flavonoid, alkaloid, senyawa fenolat dan lain-lain. Produk ini memiliki bioaktivitas dan berperan sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari pengaruh gangguan hama penyakit maupun untuk menjamin keberlangsungan hidup organisme dalam ekosistemnya (Ersam dan Mudjirahmini, 2006).

Senyawa metabolit sekunder hasil isolasi genus *Garcinia* yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya diantaranya 1,5-dihidroksi-2-metoksi **(2)** dari *G. eugeniifolia* (Fariha dkk, 2012); dulcisoflavin **(3)** dari *G. dulcis* (Deachathai dkk, 2005); tirullacol **(4)** dari *G. thwaitessi* (Leslie dkk, 1983); 3-,9-dihidroksilanol-24-en-26-ol **(5)** dari *G. speciosa* (Vieira dkk, 2004).

**(2)****(3)****(4)****(5)**

Golongan seskuiterpen yang mempunyai aktivitas dan potensial sebagai antioksidan adalah 3-5-dihidroksi-2,5-dimetiltrideka-2,9,11-trien-4,8-dion **(6)** yang diisolasi dari ranting *G. griffithii* (Elfita dkk, 2012). 7-hidroksi-4-parahidroksi fenil-6',6'-dimetilpirano kumarin **(7)**; 5-hidroksi 4-fenilkumarin **(8)**; 5,7-dihidroksi-8-(1,2-dihidroksi-3-metilbutenil-3)-4fenilkumarin **(9)** berhasil diisolasi dari ranting *G. balica*.

**(6)****(7)****(8)****(9)**

### 2.3 Metode Isolasi dan pemurnian senyawa

Beberapa tahap yang perlu diperhatikan dalam isolasi yaitu tahap pemisahan senyawa berupa ekstraksi, fraksinasi dengan cara kromatografi, pemurnian senyawa, penentuan struktur dan uji bioaktivitas.

#### 2.3.1 Ekstraksi

Metode pemisahan campuran senyawa berdasarkan perbedaan kelarutan komponen zat terlarut dalam suatu pelarut sering disebut sebagai ekstraksi. Pemisahan tersebut didasarkan pada prinsip distribusi komponen zat ke suatu pelarut yang dikenal sebagai *like dissolve like* berdasarkan perbedaan kepolaran yaitu senyawa yang non polar akan larut dalam pelarut non polar dan senyawa yang polar akan larut dalam pelarut polar maka komponen atau senyawa yang diinginkan dapat dipisahkan dari campurannya secara selektif dalam pelarut yang digunakan. Syarat suatu pelarut yang digunakan untuk ekstraksi diantaranya harus mampu melarutkan komponen senyawa, mudah untuk dipisahkan atau mudah menguap, dan sifatnya inert. Pelarut yang akan digunakan harus didistilasi terlebih dahulu untuk menghilangkan pengotor. Kepolaran pelarut ditentukan dari nilai perbedaan momen dipolnya.

Ekstraksi dibagi menjadi dua berdasarkan wujud sampelnya yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Pemisahan senyawa bahan alam umumnya menggunakan ekstraksi padat-cair. Beberapa metode ekstraksi jenis ini adalah

- Metode maserasi yaitu suatu teknik ekstraksi dengan cara perendaman bahan yang telah dihaluskan pada temperatur kamar dalam wadah tertutup dengan pelarut yang sesuai supaya zat-zat dapat larut secara sempurna. Sesuai untuk sampel tidak tahan panas. Prinsipnya pelarut akan masuk ke dalam sel melewati membran sel. Senyawa dalam sel yang konsentrasinya tinggi keluar sel dan digantikan oleh pelarut. Ekstraksi diakhiri saat mencapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa pada ekstrak maupun dalam sel sampel.

Selanjutnya, residu dari sampel dipisahkan dari ekstrak. Hasil ekstrak yang didapat akan dipekatkan atau dipisahkan dari pelarut menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

- Metode perkolasi adalah cara ekstraksi dalam pelarut yang sesuai dengan dialirkan perlahan ke suatu perkolator yaitu bejana berisi sampel dilengkapi kran untuk mengeluarkan ekstrak pada bagian bawahnya sehingga pelarut yang digunakan selalu baru dan lebih banyak (Pavia,1990). Proses ekstraksi dilakukan sampai seluruh senyawa metabolit habis terekstrak, pengamatan sederhana dilihat dari warna pelarut, bila pelarut sudah tidak berwarna biasanya metabolit sudah terekstrak. Waktu kontak pelarut dengan sampel serta temperatur dari pelarut mempengaruhi efektifitas ekstraksi. Pelarut dengan suhu tinggi akan meningkatkan kualitas ekstraksi namun perlu diperhatikan agar tidak terjadi dekomposisi senyawa.
- Metode sokletasi, yaitu ekstraksi kontinu dengan menggunakan alat soklet. Pelarut pada labu bulat dipanaskan hingga menjadi uap, kemudian uap pelarut naik ke bagian atas soklet dan mengalami kondensasi menjadi embun kembali setelah sampai di kondensor, selanjutnya bersama ekstrak turun kembali ke dalam labu bundar. Proses ini berlangsung terus menerus sehingga dapat menghemat pelarut dan dapat mengekstrak senyawa lebih banyak (J.P. Cannell, 1998).

### **2.3.2 Fraksinasi**

Proses pemisahan senyawa melibatkan pembagian campuran menjadi beberapa fraksi. Fraksi ini digolongkan berdasarkan dari kelarutan senyawa terhadap pelarut dengan tingkat kepolaran yang sama atau berdekatan. Fraksinasi senyawa dapat dilakukan menggunakan kromatografi. Kromatografi melibatkan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut antara fase gerak berupa pelarut yang berfungsi membawa senyawa dengan kepolarannya sama melewati fase diam yang berfungsi sebagai adsorben. Syarat bahan dapat

digunakan untuk adsorben adalah bahan tidak bereaksi dengan sampel atau fase gerak dan tidak larut dalam fase gerak contohnya silika, selulosa, stirena, divinilbenzena, alumina, dan karbon (J.P. Cannell, 1998). Pada penelitian ini menggunakan beberapa jenis kromatografi diantaranya kromatografi cair vakum, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi lapis tipis preparatif.

**Kromatografi cair vakum** tergolong kromatografi kolom yang ditambahkan pompa vakum untuk menarik eluen dengan tekanan sehingga eluen dapat tertarik melalui kolom. Kromatografi kolom adalah metode pemisahan yang dilakukan dengan cara pelarut sebagai fase gerak dialirkan melalui kolom sebagai fasa diamnya. Adsorben atau fasa diamnya biasanya berupa padatan polar seperti silika gel maupun padatan semi polar alumina. Sampel yang telah diimpregnasi dengan adsorben dimasukkan ke dalam kolom secara merata, eluen yang akan digunakan kemudian dimasukkan ke dalam kolom secara kontinyu. Suatu senyawa dalam sampel yang bersifat nonpolar masuk ke dalam adsorben akan mengisi rongga-rongga pada permukaan luar adsorben sehingga akan terlebih dahulu terelusi dengan pelarut nonpolar sehingga turun ke bagian bawah kolom begitu seterusnya hingga pelarut ditingkatkan kepolarannya dan senyawa polar pada bagian dalam adsorben akan terelusi. Diatur pula laju tetesan serta penambahan eluen. Tetesan yang keluar ditampung sebagai fraksi-fraksi (Ibnu, 2008). Masing-masing diamati menggunakan kromatografi lapis tipis selanjutnya fraksi dievaporasi.

**Kromatografi lapis tipis** merupakan salah satu metode kromatografi yang pemisahannya dilakukan dengan cara pelarut sebagai fase gerak dialirkan melalui lapis tipis yang melekat pada material pendukung sebagai fasa diamnya didasarkan pada adsorpsi senyawa oleh permukaan lempeng tipis untuk analisis kualitatif. Tahapan analisis kromatografi lapis tipis yaitu pertama sampel ditetaskan menggunakan pipa kapiler pada plat pada kromatografi lapis tipis digunakan adsorben halus yang melekat pada alumunium. Lapisan tipis adsorben ini pada pemisahan

berlaku sebagai fasa diam. Saat mengelusi sebaiknya diletakkan dalam wadah yang telah berisi pelarut kemudian wadah tersebut ditutup agar suasana menjadi jenuh. Pelarut akan membawa senyawa ke bagian atas plat yang ditandai munculnya noda-noda. Namun tidak semua senyawa bahan alam mampu menunjukkan noda pada hasil KLT sehingga perlu disemprot menggunakan pereaksi penampak noda yaitu serum sulfat  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N dimana pereaksi ini berwarna kuning yang selanjutnya plat KLT dipanaskan dalam oven. Dari noda yang dihasilkan dapat diidentifikasi senyawa-senyawa yang terpisah maupun dapat digolongkan berdasarkan nilai Rf yang serupa. Setiap senyawa memiliki nilai Rf yang khas. Retention faktor (Rf) dinyatakan sebagai

$$Rf = \frac{\text{jarak perpindahan senyawa}}{\text{Jarak perpindahan pelarut}}$$

Munculnya noda tunggal di plat KLT pada senyawa hasil isolai yang dielusi dengan campuran 3 eluen berbeda menjadi salah satu indikator dalam uji kemurnian senyawa sedangkan noda yang berekor menandakan kemurnian senyawa belum tercapai.

**Kromatografi lapis tipis preparatif** digunakan dalam proses pemisahan senyawa dimana penotolan cuplikan dengan cara melarutkan cuplikan dalam sedikit pelarut. Cuplikan ditotolkan berupa pita dengan jarak sesempit mungkin menggunakan pipa kapiler. Elusi plat KLTP dilakukan dalam bejana kaca yang dapat menampung beberapa plat. Bejana dijaga tetap jenuh dengan pelarut pengembang dengan bantuan kertas saring yang diletakkan berdiri disekeliling permukaan bagian dalam bejana. KLTP umumnya mengandung indikator fluorosensi yang membantu mendeteksi letak pita yang terpisah pada senyawa yang menyerap sinar ultraviolet (Hostettmann dkk,1995). Untuk mendeteksi senyawa yang tidak menyerap sinar ultraviolet yaitu dengan cara menutup plat dengan sepotong kaca lalu menyemprot kedua sisi dengan pereaksi penampak noda lalu senyawa dapat dikerok dari plat kaca. Selanjutnya senyawa harus

diekstraksi dari adsorben dengan pelarut yang sesuai lalu ekstrak yang diperoleh disaring dan dipisahkan dari pelarutnya. Cara ini berguna untuk memisahkan campuran beberapa senyawa sehingga diperoleh senyawa murni (Gritter dkk, 1991).

### **2.3.3 Rekristalisasi**

Senyawa organik berupa padatan hasil dari isolasi bahan alam memiliki kemurnian yang relatif rendah. Umumnya senyawa ini masih ada kandungan senyawa lain yang jumlahnya lebih sedikit yang dihasilkan selama proses isolasi. Pemurnian senyawa biasanya melalui proses rekristalisasi dari pelarut yang sesuai atau campuran beberapa pelarut. Pemurnian senyawa padatan berdasarkan perbedaan kelarutannya pada pelarut maupun campuran pelarut. Proses rekristalisasi terdiri dari beberapa tahap diantaranya melarutkan bahan dalam pelarut hingga larut sempurna, dapat juga dengan pemanasan. Selanjutnya didinginkan atau ditetesi dengan pelarut yang tidak melarutkan senyawa agar mendapatkan kristal kembali yang terpisah dari larutan induk. Proses ini dilakukan berulang menggunakan pelarut baru hingga didapatkan senyawa dalam keadaan murni (J.P. Cannell, 1998). Jika bahan tidak dapat larut dalam satu pelarut maupun beberapa pelarut. Campuran beberapa pelarut dengan komposisi tertentu dapat digunakan dengan catatan pelarut-pelarut ini harus saling larut. Padatan hasil rekristalisasi kemudian dikeringkan dan dilakukan uji kemurnian menggunakan penentuan titik leleh, uji KLT dengan 3 campuran eluen yang berbeda selanjutnya dilakukan penentuan struktur dengan metode spektroskopi.

### **2.3.4 Uji titik leleh**

Titik leleh suatu senyawa murni ditentukan dengan mengamati temperatur saat terjadinya perubahan dari padatan menjadi lelehan. Sejumlah sampel dimasukkan ke tabung kapiler dan diletakkan pada alat penentu titik leleh seperti *Fischer John* kemudian dipanaskan hingga suhu tertentu. Temperatur saat sampel padat mulai tampak meleleh pertama kali hingga meleleh



sempurna adalah jarak titik leleh. Senyawa murni dapat diindikasikan dengan jarak pelelehan yaitu  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Suatu jarak yang lebih besar dari  $\pm 1^\circ\text{C}$  menunjukkan masih adanya pengotor (Firdaus, 2011).

## 2.4 Tinjauan spektroskopi senyawa

Kristal senyawa yang telah murni selanjutnya ditentukan strukturnya menggunakan beberapa metode spektroskopi diantaranya :

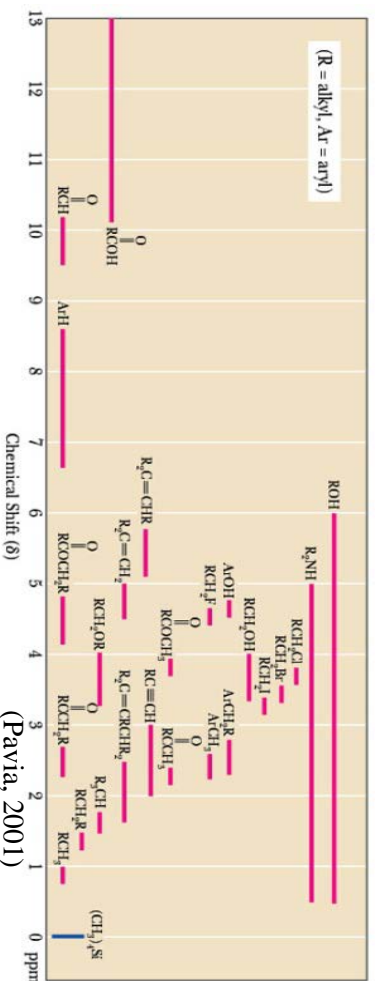
**Spektroskopi massa (MS)** merupakan teknik spektroskopi dengan cara menembakkan elektron berenergi tinggi ke sampel hingga mengalami pembentukan ion dengan teknik ionisasi tunggal sehingga hanya berguna untuk karakterisasi molekul yang dapat terion menjadi ion positif atau ion negatif dalam kondisi yang terkontrol. Spektroskopi massa dapat dibagi menjadi 3 tahapan yaitu ionisasi, analisis masa dan deteksi. Beberapa senyawa dapat mengion yang sesuai dengan penghilangan elektron tunggal dari molekul disebut ion molekul. Spektroskopi massa bergantung pada penentuan rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ). Dari ion molekul digunakan untuk menentukan berat molekul senyawa terhadap satuan massa atom yang mendekati selanjutnya dipisahkan berdasarkan ratio muatan massanya dalam daerah magnetik atau elektrik akan teramati oleh detektor sebagai ion masa molekul. (Pavia, 2001). Spektrum massa disajikan berupa grafik batangan dengan peak yang menyatakan suatu fragmen dari molekul. Peak yang muncul pada spektrum memiliki ion massa molekul ( $m/z$ ) yang nilainya meningkat dari kiri ke kanan.

**Spektroskopi Inframerah (IR)** merupakan analisis struktur molekul untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu molekul. Serapan khas untuk beberapa gugus fungsi dinyatakan pada Gambar 2. 1.

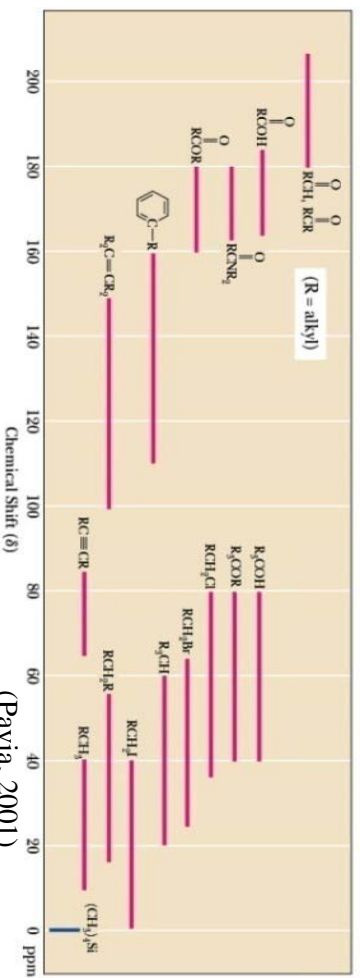


Prinsip instrumen ini adalah interaksi antara sinar radiasi elektromagnetik dengan molekul yang menyebabkan molekul bervibrasi saat sinar pada panjang gelombang IR terserap. Spektrofotometer akan mengukur sejumlah radiasi yang melewati sampel dengan frekuensi tertentu. Radiasi yang terserap muncul sebagai spektrum IR yang menyajikan persen radiasi yang ditransmisikan. Frekuensi inframerah dinyatakan dalam satuan bilangan gelombang pada daerah  $625\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  (Pavia, 2001). Dalam analisa kualitatif, identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan posisi dan intensitas relatif dari puncak-puncak spektrum dengan spektrum zat standar.. Serapan khas untuk beberapa gugus fungsi dinyatakan pada Gambar 2. 1.

**Spektroskopi resonansi magnetik inti (NMR)** merupakan metode analisis struktur molekul menggunakan perputaran inti muatan yang menghasilkan medan magnetik. Inti suatu unsur tertentu yang mempunyai spin akan menghasilkan medan magnet. Spektrum NMR ditunjukkan oleh frekuensi puncak-puncak pergeseran kimia terhadap intensitas puncak. Dalam NMR diukur perbedaan frekuensi antara suatu jenis proton dengan frekuensi resonansi proton senyawa pembanding atau senyawa standar, biasanya digunakan TMS (*Tetra Metil Silan*) sebagai senyawa standar. Sampel yang akan dianalisis dilarutkan dalam pelarut seperti  $\text{CDCl}_3$ . Metode ini memberikan informasi mengenai jenis atom, jumlah, maupun lingkungan atom hidrogen ( $^1\text{H}$  NMR) maupun karbon ( $^{13}\text{C}$  NMR). Pergeseran kimia diberi simbol  $\delta$  menyatakan bilangan sejauh mana resonansi proton bergeser dari standar dengan satuan ppm terhadap frekuensi spektrometer yang digunakan. Proton yang memiliki n proton tetangga yang ekuivalen memberikan sinyal yang pisah menjadi puncak multiplet (n+1) dengan konstanta kopling yaitu J. Multiplisitas ini antara lain *singlet* (s), *doublet* (d), *triplet* (t), *quartet* (q), dan *multiplet* (m) (Pavia, 2001). Daerah pergeseran kimia untuk  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  ditunjukkan pada Gambar 2. 2 dan Gambar 2. 3.



Gambar 2. 2. Pergeseran kimia untuk beberapa jenis proton



Gambar 2. 3 Pergeseran kimia untuk beberapa jenis karbon

## **2.5 Tinjauan Radikal Bebas dan Antioksidan**

Proses metabolisme tubuh atau faktor lingkungan seperti asap rokok, polusi udara, obat, bahan beracun, makanan kemasan, bahan aditif dan sinar ultraviolet matahari yang menyebabkan radiasi merupakan pemicu adanya radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul atau senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Hal ini menyebabkan radikal bebas bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Radikal bebas memerlukan elektron yang berasal dari pasangan elektron di sekitarnya untuk menjadi stabil sehingga terjadi perpindahan elektron dari molekul donor ke molekul radikal untuk menjadikan radikal tersebut stabil (Simanjuntak dkk, 2004). Akibat reaksi tersebut, molekul donor menjadi radikal baru yang tidak stabil dan selanjutnya menimbulkan reaksi berantai. Untuk itu radikal bebas dapat bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat dan DNA. Oleh karena itu, radikal bebas cukup berbahaya bagi makhluk hidup karena apabila reaksi ini terjadi di dalam tubuh, maka akan menimbulkan berbagai kerusakan yang menjadi penyebab berbagai penyakit. Radikal bebas yang berlebih dapat memacu timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif, seperti kanker dan penyakit jantung (kardiovaskular).

Radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan protein pada lensa mata yang mengakibatkan terjadinya katarak. Radikal bebas juga dapat merusak membran sel terutama komponen penyusun membran berupa asam lemak, merusak bagian dalam pembuluh darah yang mempermudah pengendapan berbagai zat termasuk kolesterol sehingga menyebabkan aterosklerosis. Radikal bebas dapat menyebabkan oksidasi DNA sehingga DNA termutasi dan menimbulkan kanker. Senyawa radikal juga menyebabkan terjadinya proses penuaan akibat rusaknya sel-sel jaringan tubuh (Wang dkk, 2002). Timbulnya penyakit degeneratif oleh radikal bebas dapat dihambat ataupun dicegah oleh senyawa antioksidan (Dai dkk, 2010).

Antioksidan adalah suatu senyawa kimia yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terbentuk sebagai hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi dalam tubuh (Goldberg, 2003). Senyawa antioksidan dapat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas. Senyawa antioksidan digolongkan menjadi dua kategori berdasarkan fungsinya yaitu:

a. Antioksidan primer

Antioksidan primer berperan dalam menghentikan reaksi rantai radikal bebas dengan berfungsi sebagai pendonor atom H atau elektron pada radikal bebas dan berdampak pada pembentukan produk yang lebih stabil. Contoh antioksidan yang memiliki mekanisme ini adalah vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat),  $\beta$ -karoten, glutathion dan sistein. Sedangkan BHA, BHT dan TBHQ merupakan contoh antioksidan primer yang dibuat secara sintetik.

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder atau antioksidan pencegah yaitu menurunkan kecepatan inisiasi dengan berbagai mekanisme. Pada dasarnya tujuan antioksidan sekunder adalah mencegah terjadinya radikal yang paling berbahaya yaitu radikal hidroksil. Contoh antioksidan sekunder antara lain turunan-turunan asam fosfat, asam askorbat, senyawa karoten, sterol, fosfolipid dan produk-produk reaksi maillard (Gordon, 1990).

c. Antioksidan tersier

Antioksidan tersier adalah antioksidan yang berfungsi memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Contoh dari antioksidan tersier adalah metionin sulfoksida reduktase yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang disebabkan oleh radikal bebas (Thaipong dkk, 2006).

Sedangkan senyawa antioksidan digolongkan menjadi dua kategori berdasarkan sumbernya yaitu:

1. Antioksidan alami

Antioksidan alami adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil ekstraksi bahan alam. Antioksidan alami dapat diperoleh

dari beragam sumber bahan pangan, seperti sayur-sayuran, buah-buahan, rempah-rempah, dan lain-lain. Contoh dari antioksidan alami adalah vitamin C, vitamin E, dan  $\beta$ -karoten (Pomeranz dkk, 1971).

## 2. Antioksidan sintetik

Antioksidan sintetik adalah antioksidan yang diperoleh sebagai hasil dari sintesis reaksi kimia. Contoh dari antioksidan sintetik adalah BHA, BHT dan TBHQ (Heldman dkk, 1984).

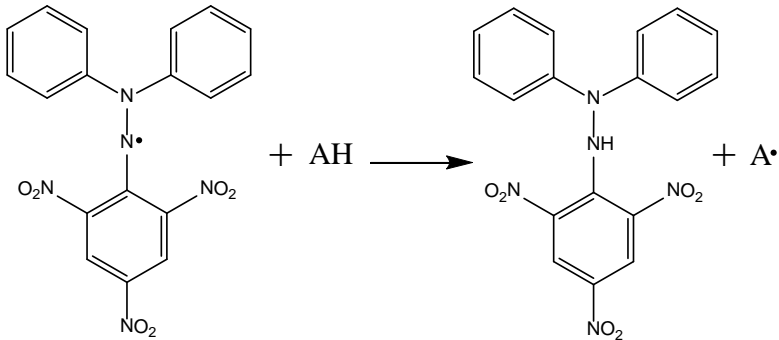
### 2.6 Metode pengujian aktivitas antioksidan

Metode pengujian aktivitas antioksidan atau pengukuran aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas dapat dilakukan dengan bermacam metode, seperti DPPH, ORAC, dan ABTS (Karadag dkk, 2009). Dalam penelitian ini menggunakan metode DPPH.

Metode DPPH merupakan salah satu metode aktivitas antioksidan yang sederhana dengan menggunakan (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) DPPH sebagai senyawa sumber radikal bebas. DPPH adalah senyawa radikal bebas yang stabil yang dapat bereaksi dengan atom hidrogen yang berasal dari suatu antioksidan membentuk DPPH tereduksi. Reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2. 4. Pengukuran kapasitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 515 nm lalu diukur serapan cahayanya dan dihitung aktivitas antioksidannya dengan menghitung persentase inhibisi, yaitu banyaknya aktivitas senyawa antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas DPPH. Penurunan absorbansi menunjukkan adanya aktivitas *scavenging* (aktivitas antioksidan).

Uji peredaman warna radikal bebas DPPH merupakan uji untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam sampel yang akan diujikan dengan melihat kemampuannya dalam menangkal radikal bebas DPPH. Prinsip dari uji ini adalah adanya donasi atom hidrogen dari substansi yang diujikan kepada radikal DPPH

menjadi senyawa non radikal difenilpikrilhidrazin yang akan ditunjukkan oleh perubahan warna (Molyneux, 2004).



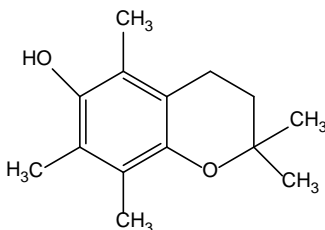
Gambar 2. 4 Reaksi penghambatan radikal bebas DPPH oleh antioksidan

Perubahan warna yang akan terjadi adalah perubahan dari larutan yang berwarna ungu menjadi berwarna kuning. Intensitas perubahan warna ini kemudian diukur pada spektrum absorpsi antara 515 nm pada larutan organik (metanol atau etanol). Pemilihan penggunaan metanol yang bersifat lebih polar dibandingkan etanol sebagai pelarut diharapkan lebih dapat mempertahankan kestabilan DPPH. Kelebihan dari metode DPPH adalah secara teknis simpel, dapat dikerjakan dengan cepat dan hanya membutuhkan spektrofotometer UV-Vis (Karadag dkk. 2009). Sedangkan kelemahan dari metode ini adalah radikal DPPH hanya dapat dilarutkan dalam media organik tidak pada media *aqueous* sehingga membatasi kemampuannya dalam penentuan peran antioksidan hidrofilik. Penentuan aktivitas antioksidan berdasarkan perubahan absorbansi DPPH harus diperhatikan karena absorbansi radikal DPPH setelah bereaksi dengan antioksidan dapat berkurang oleh cahaya dan oksigen.

Dalam penelitian ini menggunakan standar atau kontrol positif dalam uji antioksidan berupa trolox. Trolox (6-hydroxy-



2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) adalah senyawa turunan vitamin E yang memiliki sifat sebagai antioksidan. Struktur dari senyawa trolox seperti yang ditunjukkan pada gambar 2. 5.



Gambar 2. 5 Struktur senyawa Trolox

Pengukuran aktivitas antioksidan dihitung sebagai %penghambatan DPPH, dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Inhibisi DPPH (\%)} = \left[ \frac{Ab - As}{Ab} \right] \times 100$$

Dimana Ab : absorbansi blanko

As : absorbansi senyawa uji

Parameter yang juga digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan adalah  $IC_{50}$  yaitu bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas suatu radikal sebesar 50%. Untuk menentukan  $IC_{50}$  diperlukan persamaan kurva standar dari % inhibisi sebagai sumbu y dan konsentrasi antioksidan sebagai sumbu x.  $IC_{50}$  dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% ke dalam persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Dalam hal ini diharapkan bahwa radikal bebas dapat ditangkap oleh senyawa antioksidan hanya dengan konsentrasi kecil.

***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***

## **BAB III**

### **METODOLOGI PERCOBAAN**

#### **3.1 Alat dan Bahan**

##### **3.1.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya peralatan gelas dengan berbagai ukuran seperti gelas ukur, erlenmeyer, gelas kimia, labu evaporasi, vial dengan penutup, kaca arloji, *chamber* KLT, pengaduk kaca, pipa kapiler, pipet tetes, pipet ukur, corong kaca, corong vakum, pinset, neraca analitik, seperangkat alat destilasi, maserator, kolom kromatografi, lampu ultraviolet (UV) dengan  $\lambda$  254 dan 366 nm, seperangkat Kromatografi Cair Vakum (KCV), alat penguap (*rotary vacuum evaporator*), alat uji titik leleh (*Fischer John Melting Point Apparatus*), spektrofotometer FTIR, GCMS, spektrometer NMR DELTA2\_NMR JEOL RESONANCE 500 MHz.

##### **3.1.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ranting tumbuhan *G. balica* yang diperoleh dari taman nasional baluran Situbondo sebanyak 1,25 kg, beberapa jenis pelarut organik diantaranya, n-heksana, metilen klorida, etil asetat, aseton metanol, aquades, kloroform, petroleum eter, silika gel 60 (35-70 mesh) untuk kromatografi kolom, plat silika gel Merck 60 F<sub>254</sub> 0,25 mm ukuran 20 x 20 cm dengan aluminium sebagai fasa diam, pereaksi penampak nota serium sulfat (Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) dalam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, KBr, kertas saring whatman, kapas, aluminium foil, tisu.

#### **3.2 Prosedur penelitian**

##### **3.2.1 Persiapan sampel dan Uji Pendahuluan sampel**

Sampel yang akan digunakan untuk isolasi senyawa adalah ranting tumbuhan *G. balica* yang berasal dari Taman

Nasional Baluran Situbondo, Jawa Timur. Sampel dikeringkan beberapa hari untuk menghilangkan kadar air hingga beratnya menjadi 1,25 kg kemudian digiling hingga menjadi serbuk halus yang siap untuk diekstraksi. Untuk pemilihan pelarut yang sesuai untuk ekstraksi perlu dilakukan uji pendahuluan. Uji pendahuluan dilakukan dengan cara mengekstraksi serbuk kering ranting tumbuhan *G. balica* sebanyak 2 g dengan masing-masing pelarut organik yang berbeda sebanyak 10 mL seperti n-heksana, metilen klorida, etil asetat dan metanol selama 24 jam. Hasil ekstraksi diamati menggunakan KLT dengan pengamatan noda diamati dibawah lampu ultraviolet (UV), untuk menampakkan noda senyawa dengan menyemprotkan serum sulfat ke plat lalu dipanaskan dalam oven. Dari hasil ini dapat dipilih pelarut yang sesuai untuk ekstraksi sampel.

### **3.2.2 Ekstraksi**

Ekstraksi dilakukan secara maserasi selama 3 x 24 jam menggunakan pelarut metanol sebanyak 15 mL. Setiap 24 jam sekali hasil ekstrak diambil dan diganti menggunakan pelarut metanol yang baru serta dimonitoring dengan KLT. Hasil ekstrak metanol berwarna kuning kehijauan bening kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak cair yang terpisah dari residu selanjutnya dipisahkan dari pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga didapat ekstrak pekat berbentuk pasta berwarna hijau tua dengan massa 42,582 g.

### **3.2.3 Fraksinasi Ekstrak Pekat Metanol**

Ekstrak pekat dilarutkan dalam metanol untuk fraksinasi menggunakan KCV) pertama dengan eluen n-heksana, metilen klorida, etil asetat dan metanol secara berurutan masing-masing 6 kali @ 300 mL. Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dilakukan monitoring dan pengelompokkan fraksi menggunakan KLT dengan eluen metanol : kloroform 5%. Pengelompokkan fraksi-fraksi berdasarkan kemiripan  $R_f$  dan pola noda yang sama. Hasil fraksinasi menghasilkan 3 fraksi yaitu fraksi A, B, dan C. Fraksi B difraksinasi lanjut dengan KCV kedua menggunakan

eluen n-heksan 100%, etil asetat : n-heksan yang ditingkatkan kepolarannya (7,5%-60%). Pengelompokkan hasil fraksinasi menggunakan KLT dengan eluen etil asetat : n-heksan 20%. Fraksi gabungan dari fraksi B menghasilkan 7 fraksi yaitu fraksi B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7.

Fraksi B2 dipilih untuk dilakukan fraksinasi lanjutan dengan KCV ketiga menggunakan eluen n-heksana 100%, metilen klorida : n-heksan (1%-40%) yang ditingkatkan kepolarannya. Pengelompokkan hasil fraksinasi menggunakan KLT dengan eluen metilen klorida : n-heksan 90%. Fraksi gabungan dari fraksi B menghasilkan 8 fraksi yaitu fraksi B2.1, B2.2, B2.3, B2.4, B2.5, B2.6, B2.7, B2.8.

Fraksi B2.7 dilakukan fraksinasi lanjutan dengan KCV keempat menggunakan eluen metilen klorida : n-heksan (4%-40%) yang ditingkatkan kepolarannya. Pengelompokkan hasil fraksinasi menggunakan KLT dengan eluen metilen klorida : n-heksan 75%. Fraksi gabungan tersebut menghasilkan 8 fraksi yaitu fraksi B2.G.A, B2.G.B, B2.G.C, B2.G.D, B2.G.E, B2.G.F, B2.G.G, B2.G.H. Selanjutnya fraksi B2.G.B, B2.G.C, B2.G.D dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut kloroform dan metanol namun diperoleh senyawa murni dengan massa yang sangat sedikit yaitu 7 mg sehingga perlu dilakukan fraksinasi menggunakan fraksi yang lain.

Fraksi B2.G.A dipisahkan dengan KLTP menggunakan eluen etil asetat : n-heksan (15%), kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut kloroform panas dan metanol sehingga diperoleh senyawa dengan masa 23 mg.

### **3.2.4 Uji Kemurnian Senyawa**

Uji kemurnian pada senyawa hasil isolasi dapat dilakukan dengan cara uji tiga eluen dan uji titik leleh. Uji tiga eluen dilakukan dengan pengujian KLT menggunakan komposisi tiga eluen yang berbeda untuk mendapatkan posisi spot pada posisi bawah, tengah, dan atas. Eluen yang digunakan diantaranya kloroform : n-heksana (20%), etil asetat : petroleum eter (50%),

dan metanol : metilen klorida (10%) dan KLT 2D dengan eluen etil asetat : petroleum eter (50%).

Uji titik leleh dilakukan dengan meletakkan butiran kecil senyawa pada kaca preparatif pada alat pengukur titik leleh. Suhu dinaikkan secara perlahan sambil diamati perubahan fisik pada senyawa. Parameter senyawa murni yaitu memiliki selisih titik leleh  $\pm 1^\circ$ . Senyawa yang telah murni perlu diketahui daya kelarutannya dengan mengamati kelarutannya pada berbagai pelarut seperti n-heksan, kloroform, metilen klorida, etil asetat dan metanol.

### **3.2.5 Identifikasi Struktur Senyawa**

#### **3.2.5.1 Spektrofotometer IR**

Analisis menggunakan instrumen spektrofotometer FT/IR. Sampel murni ( $\pm 2$  mg) ditambah KBr lalu digerus hingga homogen menggunakan mortar, lalu dipadatkan hingga membentuk pelet yang selanjutnya ditempatkan pada tempat sampel instrumen. Pengukuran absorbansi pada bilangan gelombang  $800\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$ .

#### **3.2.5.2 Spektrometer $^1\text{H}$ NMR dan $^{13}\text{C}$ NMR**

Analisis menggunakan instrumen spektrometer  $^1\text{H}$  NMR 400 MHz. Sampel sebanyak  $\pm 5$  mg dilarutkan dalam pelarut kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) lalu dimasukkan dalam tabung sampel yang diletakkan dalam alat spektrometer dan diukur pergeseran kimianya. Sampel yang sama dengan prosedur yang serupa juga dianalisis pada spektrometer  $^{13}\text{C}$  NMR.

#### **3.2.6 Uji Antioksidan**

Uji Antioksidan dilakukan untuk mengetahui aktivitas penangkapan radikal DPPH secara kuantitatif. Metode ini diadaptasi dari prosedur uji yang telah dilaporkan oleh Brand Williams yang telah dimodifikasi oleh Dudonn'e (Brand-William dkk, 1995) (Dudonn'e dkk, 2009). Langkah pertama diawali dengan pembuatan larutan DPPH radikal dengan konsentrasi  $6 \times$

$10^{-5}$  M dengan cara melarutkan 1.182 mg DPPH kedalam 50 mL metanol. Langkah kedua yaitu pembuatan larutan stok uji dari fraksi A, C, B2.8, B2.G.A, dan senyawa **1** masing-masing 10.000  $\mu\text{g/mL}$ , kemudian dari larutan stok diencerkan menjadi konsentrasi 5000  $\mu\text{g/mL}$ , 2500  $\mu\text{g/mL}$ , 1250  $\mu\text{g/mL}$ , 625  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan tersebut *divortex mixer* selama 10 detik untuk menghomogenkan. Larutan uji masing-masing pengenceran diambil 33.33  $\mu\text{L}$  dan dimasukkan ke dalam tube yang terlindung dari cahaya, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH dan dilakukan secara *triplo*. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit diruang gelap. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Larutan Blanko yang digunakan terdiri dari 33,33  $\mu\text{L}$  metanol dalam 1 mL DPPH yang diukur pada panjang gelombang yg sama. Trolox digunakan sebagai kontrol positif. Aktivitas penghambatan radikal dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Inhibisi DPPH (\%)} = \left[ \frac{A_b - A_s}{A_b} \right] \times 100$$

Dimana  $A_b$  : absorbansi blanko

$A_s$  : absorbansi senyawa uji

***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***



## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Uji Pendahuluan Sampel**

Uji pendahuluan bertujuan untuk menentukan pelarut yang tepat untuk ekstraksi yaitu mampu mengekstrak dengan sempurna senyawa - senyawa pada sampel. Uji pendahuluan dilakukan dengan cara maserasi pada serbuk kering ranting tumbuhan *G. balica* sebanyak 2 g dengan pelarut organik yang berbeda masing-masing sebanyak 10 mL n-heksana, metilen klorida, etil asetat dan metanol dengan selama 24 jam. Hasil ekstraksi diamati menggunakan KLT untuk melihat profil noda pada senyawa dengan menyemprotkan serum sulfat ke noda lalu dipanaskan dalam oven. Berdasarkan penampakan noda KLT dapat disimpulkan bahwa pelarut yang tepat untuk maserasi adalah pelarut metanol karena senyawa-senyawa target isolasi terekstrak dengan baik dibandingkan dengan metilen klorida, n-heksana, etil asetat.

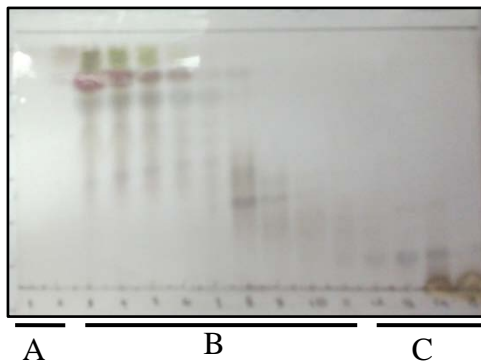
#### **4.2 Ekstraksi**

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Sampel kering ranting *G. balica* sebanyak 1,25 kg dimaserasi selama 3 x 24 jam menggunakan pelarut metanol sebanyak 15 L. Setiap 24 jam sekali hasil ekstrak diambil dan diganti menggunakan pelarut metanol yang baru serta dimonitoring dengan KLT dimana 24 jam I, 24 jam II ,dan 24 jam III untuk mengetahui konsentrasi senyawa yang sudah terekstrak. Pengamatan dilihat dari penampakan tebal atau tipisnya noda yang terbentuk dimana noda yang masih tebal menandakan konsentrasi senyawa yang terekstrak masih cukup besar dan maserasi masih dapat dilakukan kembali begitu pula sebaliknya. Harapannya agar semua senyawa dalam sampel dapat terekstrak sempurna. Hasil ekstrak metanol berwarna kuning kehijauan bening kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak cair yang terpisah dari residu dan

dipisahkan dari pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga didapat ekstrak pekat berbentuk pasta berwarna hijau tua dengan massa 42,582 g.

#### 4.3 Fraksinasi Ekstrak Pekat Metanol

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa menjadi kelompok senyawa yang lebih sederhana. Ekstrak pekat metanol (42,582 g) dilarutkan dalam metanol untuk fraksinasi menggunakan Kromatografi Cair Vakum (KCV) yang pertama dengan eluen yang memiliki kepolaran berbeda seperti n-heksana, metilen klorida, etil asetat dan metanol secara berurutan masing-masing 6 kali @ 300 mL. Senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dengan eluen akan terekstrak dalam pelarut tersebut. Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dilakukan monitoring serta pengelompokkan fraksi menggunakan KLT yang dielusi dengan metanol : kloroform (5%). Pengelompokkan fraksi-fraksi berdasarkan pada kemiripan  $R_f$  dan pola noda yang sama seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4. 1 Kromatogram hasil KCV pertama yang dielusi dengan metanol : kloroform 5%

Fraksi gabungan dari fraksinasi tersebut diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan 3 fraksi pekat yaitu fraksi A (0,944 g), B (7,391 g) ,dan C (28,009 g) seperti pada Gambar 4. 2



Gambar 4. 2 Kromatogram fraksi gabungan KCV pertama yang dielusi dengan metanol : kloroform 5%

Fraksi B sebesar 7,391 g difraksinasi menggunakan Kromatografi Cair Vakum (KCV) kedua dengan eluen n-heksana 100%, campuran etil asetat : n-heksana (7,5% - 60%) yang ditingkatkan kepolarannya dan etil asetat 100% secara berurutan sambil dimonitoring dengan KLT. Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dilakukan monitoring dan pengelompokkan fraksi menggunakan KLT yang dielusi dengan metanol : kloroform 2% seperti pada Gambar 4. 3. Fraksi gabungan dari fraksinasi tersebut diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan 7 fraksi yaitu fraksi B1 (1,349 g), B2 (1,157 g), B3 (0,544), B4 (1,315 g), B5 (0,877), B6 (0,452 g), B7 (0,273 g)



Gambar 4. 3 Kromatogram fraksi gabungan KCV kedua yang dielusi dengan metanol : kloroform 2%

Fraksinasi lebih lanjut dilakukan terhadap fraksi B2 sebesar 1,157 g menggunakan KCV yang ketiga dengan eluen n-heksana 100%, gabungan metilen klorida : n-heksana (1% - 40%) yang ditingkatkan kepolarannya secara berurutan sambil dimonitoring dengan KLT. Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dilakukan monitoring dan pengelompokkan fraksi menggunakan KLT yang dielusi dengan metilen klorida : n-heksan 90%. Fraksi gabungan dari fraksinasi tersebut diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan 8 fraksi yaitu fraksi B2.1 (0,030 g), B2.2 (0,100 g), B2.3 (0,0002 g), B2.4 (0,156 g), B2.5 (0,063 g), B2.6 (0,773 g), B2.7 (0,504 g), B2.8 (0,227 g).

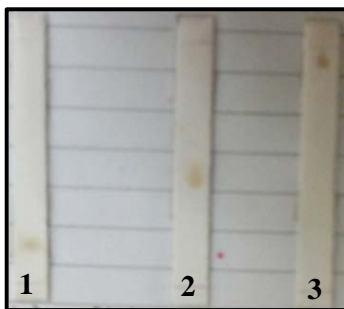
Fraksi gabungan B2.7 difraksinasi lanjutan dengan KCV ke empat menggunakan eluen metilen klorida : n-heksan (4%-40%) yang ditingkatkan kepolarannya secara berurutan sambil dimonitoring dengan KLT. Hasil fraksinasi ditampung dalam vial dan dilakukan monitoring dan pengelompokkan fraksi menggunakan KLT yang dielusi dengan metilen klorida : n-heksan 75%. Fraksi gabungan dari fraksinasi tersebut diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan 8 fraksi yaitu fraksi B2.G.A (0,247 g), B2.G.B (0,083 g), B2.G.C (0,063 g), B2.G.D (0,014 g), B2.G.E (0,062 g), B2.G.F (0,076 g), B2.G.G (0,044 g), B2.G.H (0,062 g). Selanjutnya fraksi B2.G.B, B2.G.C, B2.G.D dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut kloroform dan metanol tetapi senyawa target yang dihasilkan sebanyak 0,160 g belum murni sehingga dilakukan rekristalisasi kembali namun hasilnya terlalu sedikit yaitu masanya 7 mg sehingga perlu dilakukan fraksinasi kembali untuk mendapatkan senyawa target.

Fraksi B2.G.A diambil 0,201 g dan dilakukan pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) menggunakan eluen etil asetat : n-heksan (15%) kemudian dimurnikan dengan rekristalisasi dilakukan dengan cara melarutkan senyawa hingga sempurna menggunakan pelarut kloroform sambil dipanaskan lalu disaring untuk memisahkan

dengan pengotor yang tidak larut selanjutnya ditambahkan tetes demi tetes pelarut yang tidak melarutkan yaitu metanol selanjutnya didinginkan untuk membentuk endapan kembali yang lebih murni lalu disaring untuk memisahkan dari filtrat sehingga diperoleh senyawa **1** seberat 23 mg berbentuk pasta tak berwarna.

#### 4.4 Uji Kemurnian Senyawa

Uji kemurnian pada senyawa **1** dilakukan dengan cara uji tiga eluen, KLT 2D dan uji titik leleh. Uji tiga eluen dilakukan pengujian dengan KLT menggunakan tiga komposisi eluen yang berbeda yaitu Eluen yang digunakan diantaranya kloroform : n-heksana : (20%) (1), etil asetat : petroleum eter (50%) (2), dan metanol : metilen klorida (10%) (3) yang menunjukkan noda tunggal dengan posisi  $R_f$  yang berbeda seperti pada Gambar 4. 4 dan KLT 2D dengan eluen etil asetat : petroleum eter (50%) seperti pada Gambar 4. 5. Selanjutnya dilakukan uji titik leleh yang diketahui bahwa titik leleh senyawa **1** adalah  $67^{\circ}\text{C}$  -  $68^{\circ}\text{C}$ . Hasil tersebut sesuai dengan salah satu indikator senyawa murni yaitu memiliki rentang suhu saat mulai meleleh hingga meleleh seluruhnya  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Hasil uji kelarutan menunjukkan bahwa senyawa **1** larut sempurna dalam pelarut kloroform. Data ini yang digunakan untuk analisis penentuan struktur menggunakan metoda spektroskopi IR,  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR dan GCMS.



Gambar 4. 4 Hasil Uji tiga eluen pada senyawa **1**

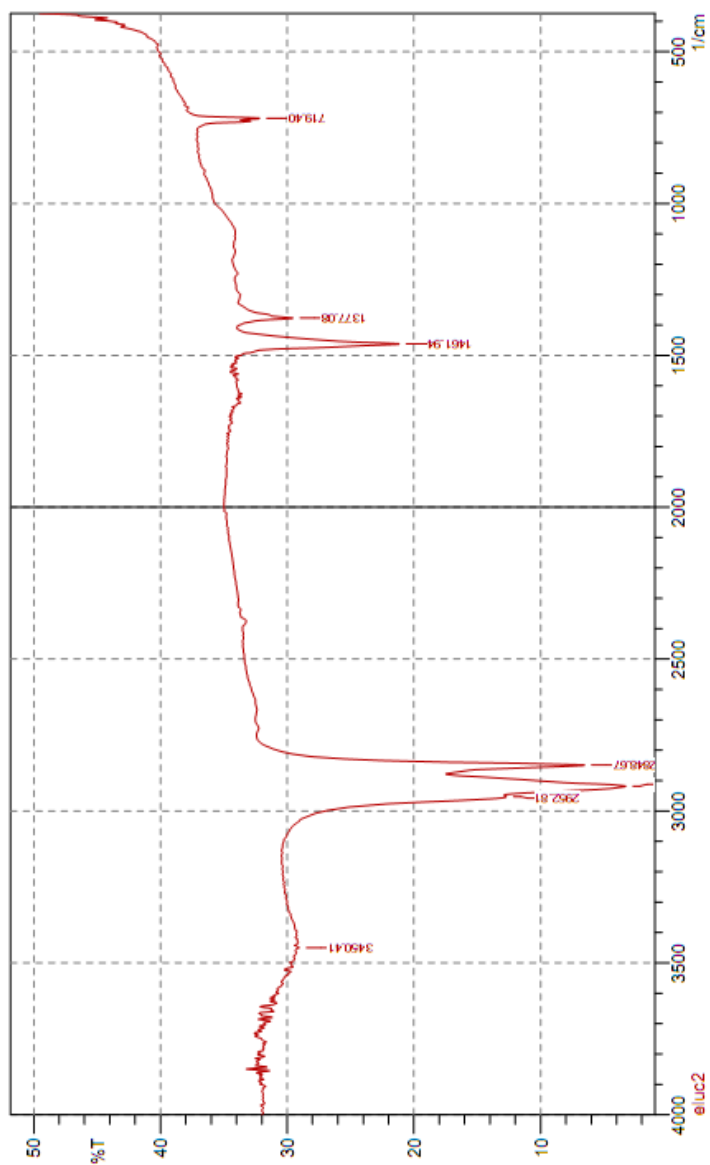


Gambar 4. 5 Hasil Uji KLT 2D pada senyawa **1**

#### 4.5 Penentuan struktur Senyawa **1**

Senyawa **1** seberat 23 mg berbentuk pasta tak berwarna memiliki titik leleh  $67^{\circ}\text{C}$  -  $68^{\circ}\text{C}$ . Penentuan struktur dilakukan menggunakan data analisis menggunakan , spektroskopi IR,  $^1\text{H}$  NMR, dan  $^{13}\text{C}$  NMR.

Spektrum IR senyawa **1** menunjukkan bilangan gelombang ( $\bar{\nu}_{\text{maks}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3450,41; 2952,81; 2918,10; 2848,67; 1461,94; 1377,08; 719,40. Data tersebut mengindikasikan serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi yaitu, bilangan gelombang ( $\bar{\nu}_{\text{maks}}$ )  $3450,41\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya suatu gugus hidroksi bebas,  $\bar{\nu}_{\text{maks}}$  2952,81; 2918,10 dan  $2848,67\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya C-H alifatik berupa gugus metil ( $-\text{CH}_3$ ), gugus metilen ( $-\text{CH}_2$ ), gugus metin ( $-\text{CH}$ ). Serapan pada  $\bar{\nu}_{\text{maks}}$   $1461,94\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gem dimetil dan  $1377,08\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan karbon dengan oksigen (C-O). Data spektrum IR tersebut menggambarkan ciri khas senyawa golongan terpen. Analisis menggunakan spektroskopi IR terhadap senyawa **1**, memberikan hasil data spektrum seperti pada Gambar 4. 6.



Gambar 4. 6 Hasil spektrum IR senyawa 1 dalam KBr

Hasil analisis menggunakan spektrometer  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR pada senyawa **1** diperoleh beberapa data yaitu nilai geseran kimia, integrasi puncak, dan multiplisitas. Analisis DEPT 135 menunjukkan perbedaan peak antara karbon metilen ( $\text{CH}_2$ ) yang ditunjukkan peak ke bawah garis dasar dengan peak karbon metin ( $\text{CH}$ ) dan metil ( $\text{CH}_3$ ) yang ke atas garis dasar. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR dan DEPT 135 senyawa **1** dapat ditunjukkan pada Tabel 4.1

Tabel 4. 1 Data pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  spektrum  $^1\text{H}$  NMR,  $\delta_{\text{C}}$  spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR, dan DEPT 135 pada senyawa **1**.

No. C	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR	DEPT 135
1	3,47 (1H, s)	59,67	CH
2		31,27	C
3	1,42 (2H, d)	14,03	$\text{CH}_2$
4	1,11 (1H, m)	37,17	CH
5		31,94	C
6	1,26 (12H, s)	29,70	$\text{CH}_3$
7		29,70	$\text{CH}_3$
8	0,86 (3 H, d)	22,68	$\text{CH}_3$
9		29,70	$\text{CH}_3$
10	1,26 (12H, s)	29,70	$\text{CH}_3$

Hasil analisis spektrum  $^1\text{H}$  NMR menunjukkan bahwa pola sinyal proton pada senyawa **1** mencirikan golongan suatu senyawa metabolit sekunder berupa alkohol siklik yaitu berada pada daerah dibawah sekitar  $\delta_{\text{H}}$  2,00 ppm untuk proton pada karbon alifatik. Pada spektrum terlihat adanya sinyal metil dengan puncak *doublet* dengan integrasi 3H pada  $\delta_{\text{H}}$  0,86 ppm yang terkopling oleh satu proton tetangga sehingga muncul sebagai puncak *doublet*. Pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}}$  3,47 (1H, s) merupakan sinyal dari proton metin yang terikat pada C yang juga mengikat



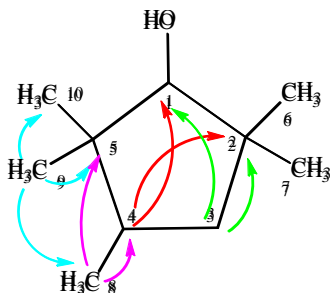
gugus hidroksi dan proton metin dengan lingkungan kimia yang berbeda juga muncul pada  $\delta_H$  1,11 (1H, m) yang terkopling oleh proton-proton yang terikat pada C tetangga. Sinyal pada  $\delta_H$  1,42 (2H, d) dimungkinkan berasal dari proton metilen. Munculnya sinyal singlet pada  $\delta_H$  1,26 dengan integrasi proton sebanyak 12 diinterpretasikan terdiri dari empat proton metil dengan lingkungan yang sama sehingga muncul dalam puncak yang sama.

Pola sinyal karbon pada senyawa **1** mengindikasikan suatu alkohol siklik yaitu bertumpuk pada daerah dibawah  $\delta_C$  60 ppm. Sinyal karbon senyawa **1** berjumlah 10 karbon memperkuat. Adanya pita serapan gugus hidroksi yang muncul pada spektrum IR didukung oleh data spektrum  $^{13}C$  NMR yang muncul sinyal metin pada  $\delta_C$  59,67 ppm milik C1 yang mengikat gugus hidroksi. Sinyal karbon metin yang lain muncul pada 37,17; satu karbon metilen pada 14,03 ppm. Pita serapan gugus metil yang muncul pada spektrum IR didukung oleh data spektrum  $^{13}C$  NMR yang muncul pada empat karbon yang ekuivalen pada 29,70 ppm mengindikasikan karbon metil yang ekuivalen adalah jenis metil geminal serta karbon metil yang lain muncul pada 22,68.

Untuk memperkuat analisis struktur dan letak gugus pensubstitusi pada senyawa **1** maka dilakukan NMR 2D-HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) yaitu korelasi jarak jauh antara proton dengan karbon tetangga menggunakan spektrum. Melalui data HMBC ini dapat diketahui proton-karbon dengan jarak dua atau tiga ikatan sehingga secara tidak langsung dapat digunakan untuk mengetahui karbon-karbon tetangga yang memiliki jarak dua sampai tiga ikatan dengan suatu proton tertentu. Data hasil korelasi disajikan pada Tabel 4. 2 dan diinterpretasikan pada Gambar 4. 7.

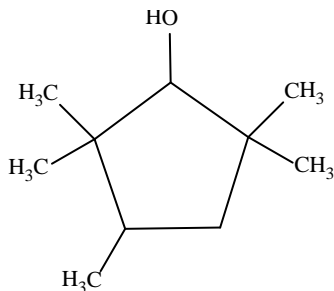
Tabel 4. 2 Data korelasi HMBC pada senyawa 1

$\delta_H$	Berkorelasi dengan $\delta_C$
1, 26 (H-9)	22, 68 (C-8); 29, 70 (C-10); 31, 94 (C-5)
1, 42 (H-3)	31, 27 (C-2); 59, 67 (C-1)
1, 11(H-4)	31, 27 (C-2); 59, 67 (C-1)
0, 86 (H-8)	37, 17 (C-4); 31, 94 (C-5)



Gambar 4. 7 Korelasi HMBC pada senyawa 1

Berdasarkan hasil analisis menggunakan spektrofotometer IR, NMR 1D dan 2D maka dapat disarankan senyawa **1** adalah senyawa metabolit sekunder alkohol siklik berupa 2,2,3,5,5-pentametil-1-pentanol seperti pada Gambar 4.8. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan.

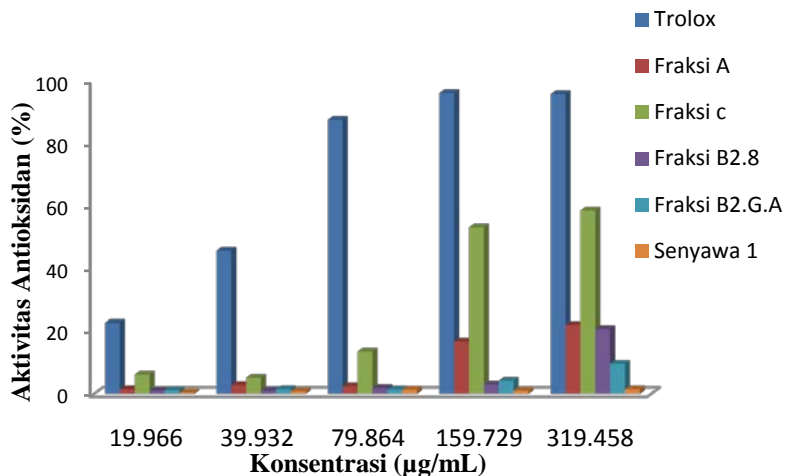


Gambar 4. 8 Struktur senyawa 2,2,3,5,5-pentametil-1-pentanol

#### 4.6 Uji Antioksidan

Pengujian antioksidan menggunakan metode pengukuran aktivitas antioksidan pada penelitian ini adalah metode penghambatan radikal bebas *1,1-difenil-2-pikril-hidrazil* (DPPH). Pada proses pengujian, senyawa uji akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas DPPH sehingga DPPH tereduksi menjadi senyawa bukan radikal yaitu 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin yang stabil yang dapat diamati dengan adanya perubahan warna ungu menjadi kuning pucat atau tidak berwarna (Dudonn'e dkk, 2009). Pengukuran aktivitas antioksidan sampel atau penghambatan radikal diukur melalui absorbansi yang dihasilkan sampel setelah ditambahkan DPPH pada hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 515 nm (Brand-William dkk, 1995). Pada panjang gelombang tersebut menunjukkan bahwa pengukuran serapan atas penghambatan seluruh larutan uji terhadap radikal bebas DPPH. Pengukuran secara kuantitatif dinyatakan sebagai kemampuan suatu senyawa uji dalam menghambat radikal DPPH ditunjukkan dengan penurunan nilai absorbansi larutan uji yang dihitung terhadap larutan blanko. Besarnya aktivitas penghambatan radikal bebas dinyatakan dengan  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*) yaitu besarnya konsentrasi larutan uji yang mampu menurunkan 50% absorbansi larutan DPPH dibandingkan terhadap blanko yaitu berupa larutan DPPH dan metanol tanpa adanya senyawa uji. Apabila  $IC_{50} < 1$  mg/mL maka senyawa uji tersebut mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Noorhajati, 2014).

Sampel uji yang diukur aktivitas antioksidan adalah fraksi A, C, B2.8, B2.G.A, dan senyawa **1** serta trolox sebagai kontrol positif dengan beberapa variasi konsentrasi yaitu 10.000  $\mu\text{g/mL}$ , 5000  $\mu\text{g/mL}$ , 2500  $\mu\text{g/mL}$ , 1250  $\mu\text{g/mL}$ , dan 625  $\mu\text{g/mL}$ . Data pengukuran absorbansi serta persentase penghambatan DPPH pada sampel diatas ditunjukkan pada tabel 4.3. dan persentase penghambatan pada sampel uji disajikan pada gambar 4.8

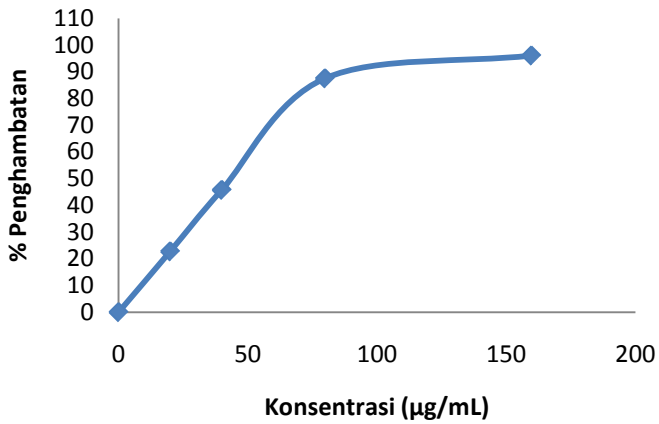


Gambar 4. 9 Aktivitas DPPH dari trolox, fraksi A, C, B2.8, B2.G.A, dan senyawa 1.

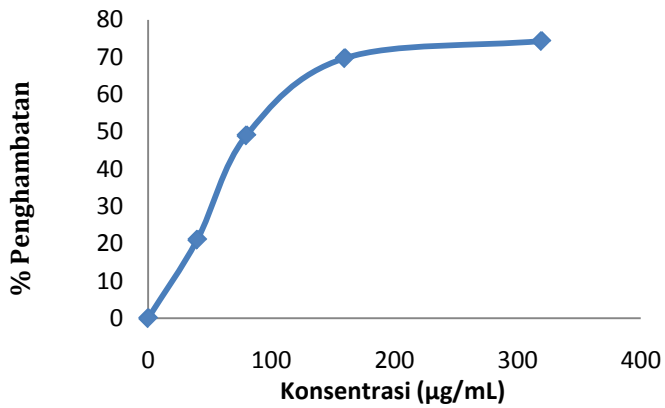
Tabel 4.3 menunjukkan persentase penghambatan pada beberapa fraksi dan senyawa 1. Dari data tersebut didapatkan persentase penghambatan 50 % keatas hanya dimiliki oleh trolox sebagai kontrol positif yang juga ditandai berubahnya larutan uji dari ungu menjadi kuning yang menunjukkan berkurangnya absorbansi DPPH dan fraksi C. Sedangkan pada fraksi A, B2.8, B2.G.A, dan senyawa 1 memiliki persentase penghambatan dibawah 50 % pada konsentrasi 319.458 µg/mL sehingga dapat diketahui bahwa fraksi A, B2.8, B2.G.A, dan senyawa 1 pada konsentrasi 319.458 µg/mL tidak aktif terhadap pengujian DPPH. Setelah diperoleh persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi pada larutan uji, maka dibuat kurva persentase penghambatan DPPH dari trolox dan fraksi C yang menghasilkan persamaan linier untuk perhitungan nilai  $IC_{50}$  dimana x adalah konsentrasi (µg/mL) dan y adalah persentase inhibisi sebagaimana terlihat pada Gambar 4. 9 dan Gambar 4. 10 dari kontrol positif trolox dan fraksi C.

Tabel 4. 3 Hasil Uji aktivitas antioksidan

Sampel	Konsentrasi µg/mL	Absorbansi		% Penghambatan DPPH	IC50 µg/mL
		Blanko	Sampel		
Trolox	19.966	0.652	0.477	22.744	39.400
	39.932		0.335	45.756	
	79.864		0.077	87.520	
	159.729		0.024	96.056	
	319.458		0.026	95.732	
Fraksi A	19.966	0.652	0.642	1.483	-
	39.932		0.633	2.864	
	79.864		0.635	2.506	
	159.729		0.566	16.829	
	319.458		0.507	22.046	
Fraksi C	19.966	0.652	0.611	6.240	86.500
	39.932		0.514	21.074	
	79.864		0.332	49.054	
	159.729		0.197	69.770	
	319.458		0.167	74.373	
Fraksi B2.8	19.966	0.652	0.645	1.023	-
	39.932		0.645	1.023	
	79.864		0.639	1.893	
	159.729		0.614	3.018	
	319.458		0.516	20.767	
Fraksi B2.G.A	19.966	0.652	0.644	1.176	-
	39.932		0.642	1.483	
	79.864		0.642	1.432	
	159.729		0.625	4.246	
	319.458		0.589	9.668	
Senyawa 1	19.966	0.652	0.649	0.409	-
	39.932		0.646	0.870	
	79.864		0.643	1.381	
	159.729		0.637	1.023	
	319.458		0.642	1.483	



Gambar 4. 10 Aktivitas Penghambatan DPPH dari Trolox



Gambar 4. 11 Aktivitas Penghambatan DPPH dari Fraksi C

Nilai  $IC_{50}$  pada trolox sebagai kontrol positif sebesar 39, 400  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan  $IC_{50}$  pada Fraksi C sebesar 86, 50  $\mu\text{g/mL}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menunjukkan aktif sebagai agen antioksidan. Nilai  $IC_{50}$  dari uji DPPH menunjukkan bahwa fraksi C mempunyai aktivitas penghambatan DPPH lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi yang lain maupun pada senyawa **1** namun memiliki aktivitas penghambatan lebih rendah dibandingkan trolox sebagai kontrol positif.

*“Halaman ini sengaja dikosongkan”*



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

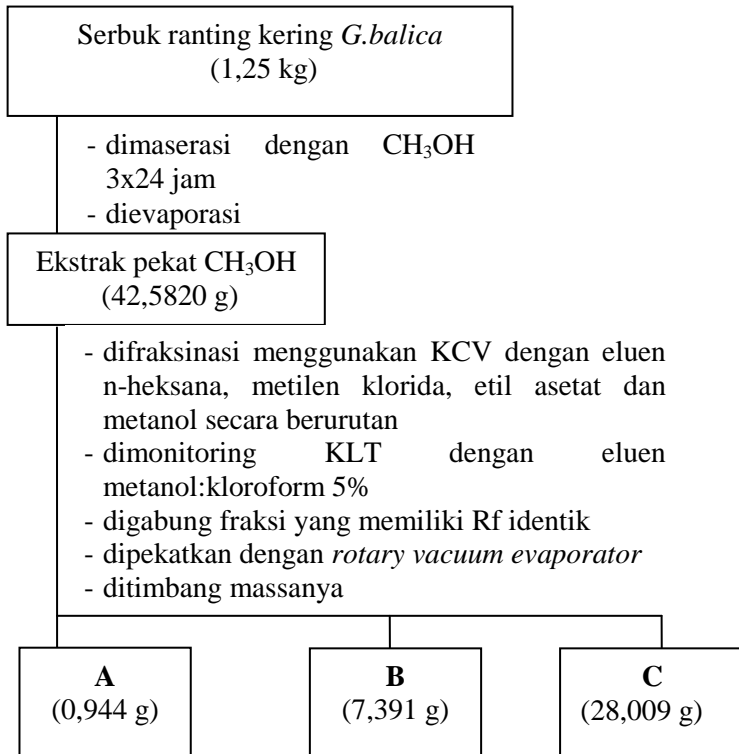
#### **5.1 Kesimpulan**

Isolasi senyawa dari ranting *G. balica* asal Taman Nasional Baluran, Banyuwangi, Jawa Timur menghasilkan sebuah senyawa metabolit sekunder berupa alkohol siklik. Metode isolasi dilakukan dengan maserasi eluen metanol sedangkan metode pemisahan dilakukan dengan KCV, KLT, KLTP. Identifikasi dilakukan dengan spektroskopi IR,  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR. Faksi A, B2.8, B2.G.A, dan senyawa **1** tidak aktif terhadap pengujian DPPH pada konsentrasi 319.458  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan pada fraksi C memiliki aktivitas penghambatan DPPH dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  86,50  $\mu\text{g/mL}$ .

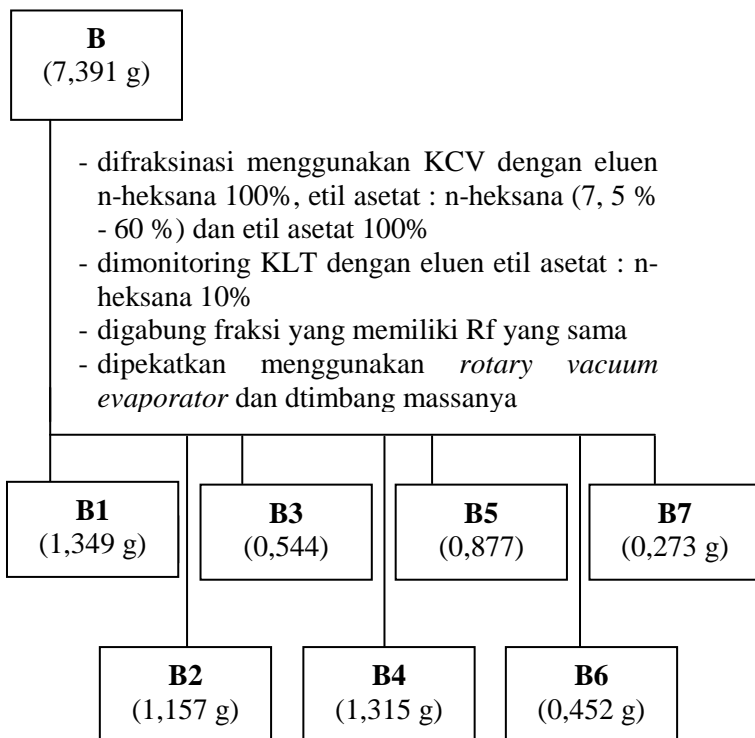
#### **5.2 Saran**

Penelitian terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan *G. balica* perlu dilanjutkan, mengingat masih banyak komponen-komponen potensial dari fraksi tumbuhan tersebut yang belum dilaporkan pada penelitian ini.

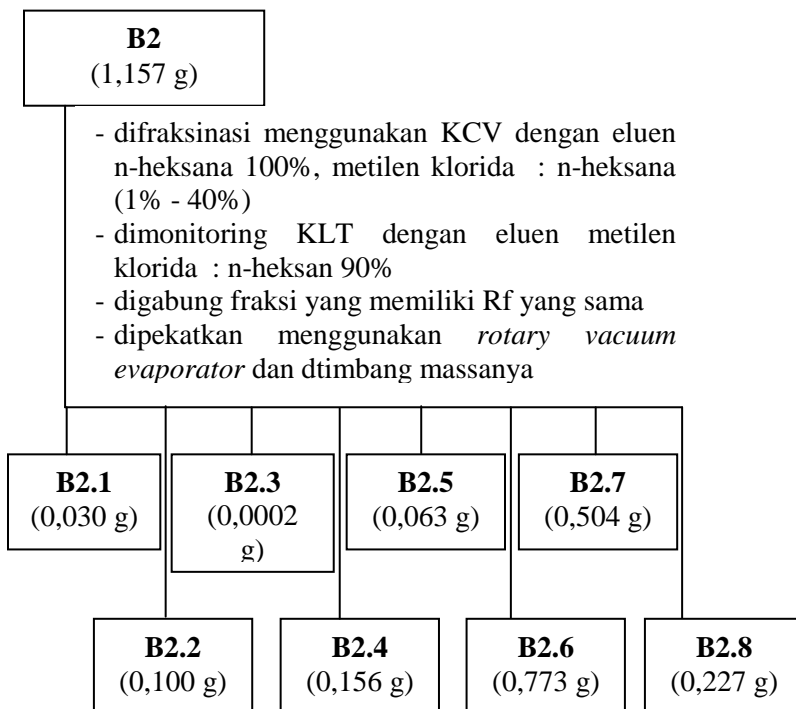
*“Halaman ini sengaja dikosongkan”*

**LAMPIRAN A : SKEMA KERJA**1. Isolasi ekstrak metanol dari ranting *G. balica*

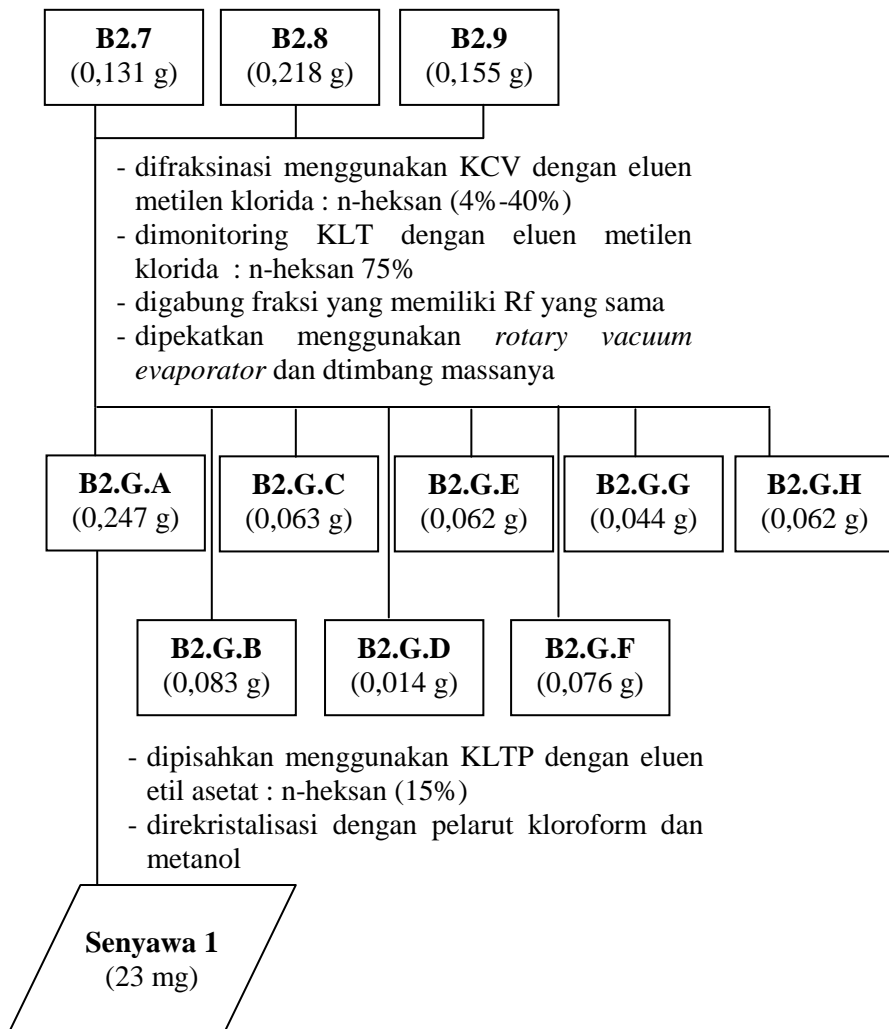
## 2. Fraksinasi fraksi B



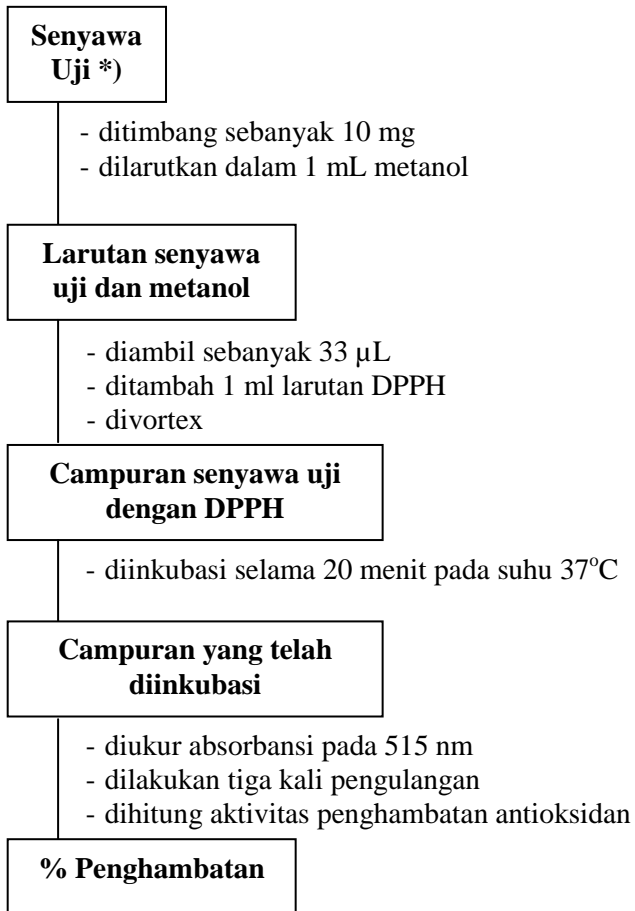
## 3. Fraksinasi fraksi B2



4. Fraksinasi fraksi gabungan B2.7, B2.8, B2.9

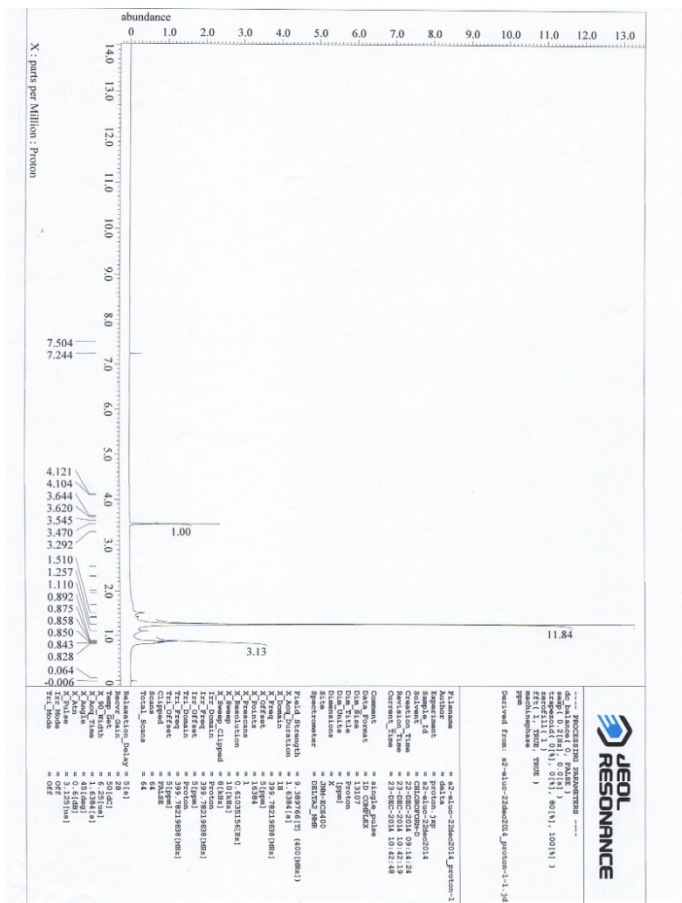


## 5. Uji Aktivitas Antioksidan



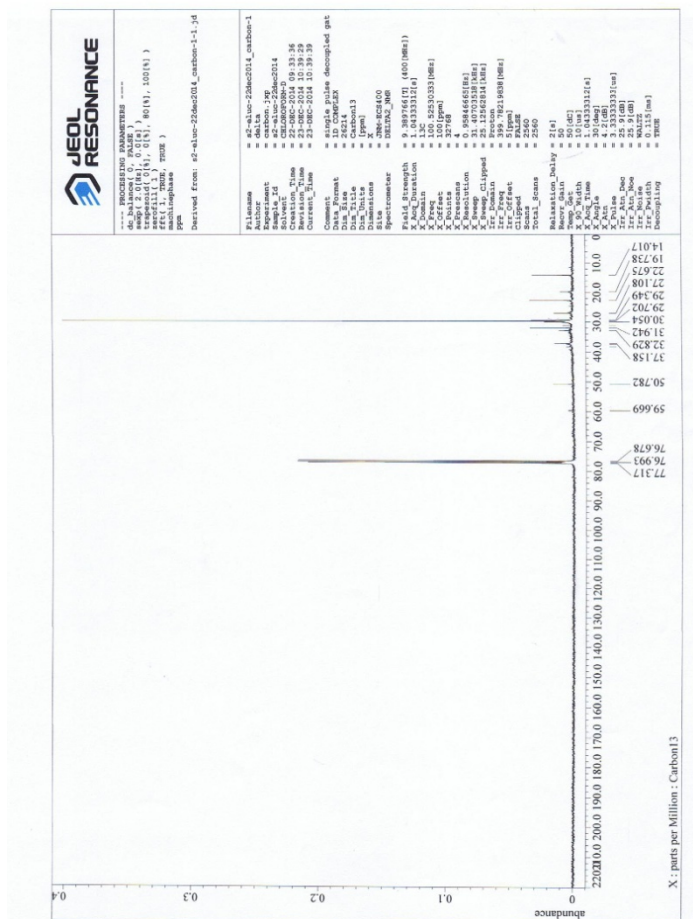
\*) Fraksi A, C, B2.8, B2.G.A, dan senyawa 1

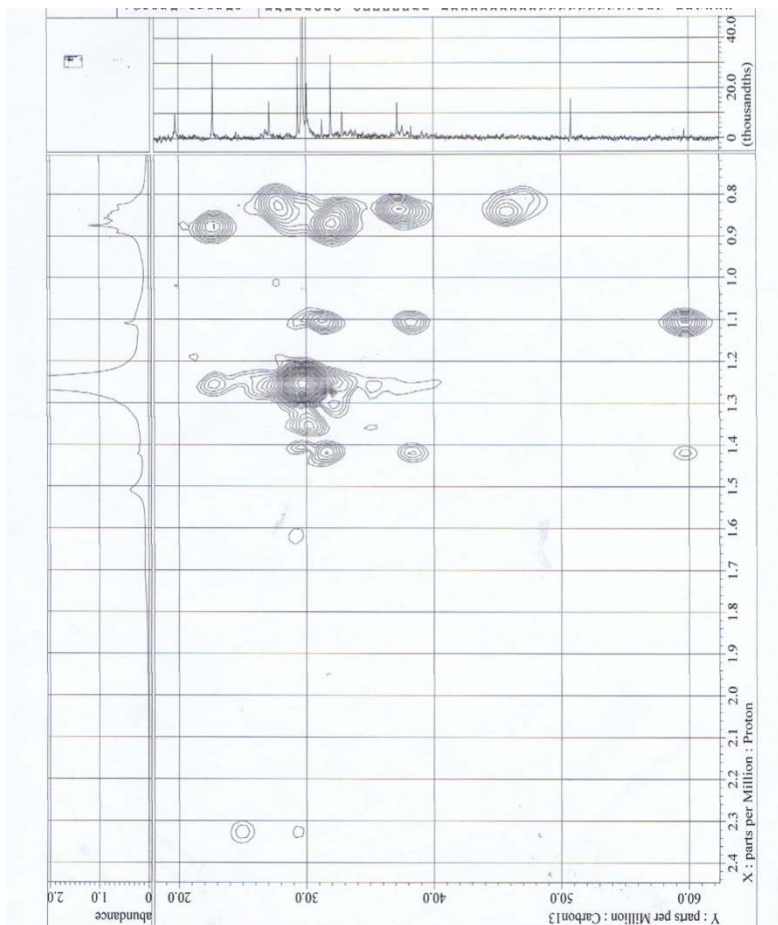
## LAMPIRAN B : SPEKTRUM $^1\text{H}$ NMR SENYAWA 1






### LAMPIRAN C : SPEKTRUM <sup>13</sup>C NMR SENYAWA 1



**LAMPIRAN D : SPEKTRUM HMBC SENYAWA 1**

## LAMPIRAN E : HASIL IDENTIFIKASI TUMBUHAN

FROM : TN BALURAN FAX NO. : 0333463064 Jun, 24 2014 09:43PM 1



**KEMENTERIAN KEHUTANAN**  
**DIREKTORAT JENDERAL PERLINDUNGAN HUTAN DAN KONSERVASI ALAM**  
**BALAI TAMAN NASIONAL BALURAN**  
 Jl. Raya Banyuwangi Situbondo Km. 38, Wanasari, Banyuwangi, Jember  
 Situbondo - 68374, Telp. (0333) 461658 Fax. (0333) 463864  
 Website : [www.baluranationalpark.web.id](http://www.baluranationalpark.web.id) E-mail : [baluranationalpark@gmail.com](mailto:baluranationalpark@gmail.com)

---

**SURAT KETERANGAN**  
**No. S.02/BTN.BI2.1-5/2014**

Berdasarkan Surat Ijin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI) nomor S.369/BTN.Bir-1.3/2014 tanggal 13 Juni 2014 dan surat ketua jurusan kimia fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya nomor 303/IT.2.1.1.4/KS.00.00/2014 tanggal 8 Mei 2014, menerangkan bahwa :

Nama : Uchik Nur Hidayatika  
 Pekerjaan : Mahasiswa Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya  
 Alamat : RT 04, RW 01 Kelurahan Kapasmaraya Baru, Tambaksari Surabaya


Untuk keperluan penelitian dan pengumpulan data untuk keperluan penelitian dan pengumpulan data untuk keperluan penelitian di Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya berupa specimen tumbuhan bagian kulit dan akar dengan spesifikasi jenis dan volume sampel sebagai berikut :

Nama daerah : Mundu alas  
 Nama latin : *Garcinia balica*  
 Bagian ranting : 5 Kg  
 Bagian akar sebanyak : Kg

Dengan ketentuan :

1. Pengambilan specimen tumbuhan tidak terdapat di zona inti kawasan TN Baluran.
2. Specimen tumbuhan hanya diperkenankan untuk pengembangan penelitian dan ilmu pengetahuan.
3. Specimen tumbuhan tersebut tidak untuk kepentingan komersial.
4. Hasil penelitian terhadap specimen tumbuhan agar segera dilaporkan kepada Kepala Balai TN Baluran

Demikian surat keterangan ini dibuat



Kepala Balai  
 Endah Suwami, MSc  
 NIP. 19611101 198903 2 001

## DAFTAR PUSTAKA

- Chappell, J., Robert M.C. (2010). *Sesquiterpenes*. USA: University of Kentucky.
- Cowan, R. (1999). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Coyle, M. B. (2005). *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology.
- Dai J., M. R. ( 2010 ). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules Vol. 15* , 7313-7352.
- Deachathai, S., Mahabusarakam W., Phongpaichit S., Taylor W.C. (2005). Phenolic Compounds from The Fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry, Vol 66, No 19* , 2368-2375.
- Derrick, M. R., Dusan S., James M. L. (1999). *Infrared Spectroscopy in Conversation Science*. New York: United States of America.
- Elfita, Muharni, Munawar, Rizki. (2012). Isolation of Antioxidant Compound from Endophytic Fungi *Acremonium* sp. from the Twigs of *Kandis Gajah*. *Makara Journal of Science 16/1* , 46-50.
- Ersam, T. (2001) *Senyawa Kimia Mikromolekul Beberapa Tumbuhan Artocarpus Hutan Tropika Sumatera Barat*. Disertasi, PPs. ITB. Bandung.
- Ersam T. (2001). *Senyawa kimia mikromolekul beberapa tumbuhan artocarpus hutan tropika*. *Disertasi PPs ITB* .

- Ersam T., Mudjirahmini. D. (2006). 4-fenilkumarin pada fraksi polar ekstrak etil asetat dari batang *Garcinia balica*. *Seminar Nasional Kimia VII*. Surabaya.
- Firdaus, M.S. (2011). *Teknik Dalam Laboratorium Kimia Organik*. Makasar: Universitas Hasanuddin.
- Fahira, N., Ikhrum M.S. (1983, 09th-11th July). Xanthone from *Garcinia eugeniifolia* (Guttiferae). *UMT 11th International Annual Symposium on Sustainability Science and Management, Terengganu, Malaysia* .
- Goldberg, G. (2003). *Plants: Diet and Health*. State Avenue, Ames, USA: I Owa State Press, Blackwell Publishing Company 2121 .
- Gordon, M. H. (1990). *The Mechanism of Antioksidants Action in Vitro*. In : Hudson, B.J.F. (ed). *Food Antioksidants*. Elsevier Applied Science. London New York.
- Gritter, R.J., Bobbit J.M., Schwarting A.E. (1991). *Pengantar Kromatografi. Terbitan Kedua. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata*. Bandung: Penerbit ITB.
- Heldman D. R., Singh P. R. (1984). *Introduction to Food Engineerin*. London: Academic Press, Inc.
- Hostettmann, K., Hostettmann M., Marston A. (1995). *Cara Kromatografi Preparatif. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata*. Bandung: ITB.
- Ibnu G. G., Abdul. R. (2008). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- J.P. Cannell Ricard. (1998). *Natural Products Isolation*. New Jersey: Humana Press.
- Karadag A., Ozcelik B., Saner S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods Vol. 2* , 41-60.
- Leslie, A., Badra H.T., Subramaniam S. (1983). 2,5- dihydroxy-1,6-dimethoxy xanthone and biflavonoids of *Garcinia Thwaitesii*. *Phytochemistry, Vol 22, No 1* , 233-235.
- Manito, Paolo, Sammes. (1992). *Biosintesis Produk Alami*. Semarang: Semarang Press.
- Masrukhan. (2010). *Isolasi dan Penentuan Struktur Kimia serta Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak n-heksana Kulit Batang Garcinia Bancana Miq*. Depok: Universitas Indonesia.
- Molyneux P. (2004). The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Science and Technology Vol. 26 (2)* , 211-219.
- Pavia D.L., Lampman. G.M., Knitz. G.S. (1990). *Introduction to organic laboratory techniques a conteporery approach. second edition*. New York: Sainders Colleege Publishing.
- Pavia, Lampman, Kriz. (2001). *introduction to spectroccopy third edition*. Washington: Thomson Learning.
- Pomeranz, Y., Meloan, C. E. (1971). *Food Analysis: Theory and Practice. 3rd edition*. USA: Chapman and Hall.

- Sari, R. dan Hanan A. (2000). *Garcinia (Clusiaceae) di Kebun Raya Bogor : Fisiognomi, Keragaman dan Potensi. Proseeding Seminar Hari Cinta Puspa dan Satwa Nasional Kebun Raya Bogor*. Bogor.
- Sukpondma, Y., Vatcharin R., Souwalak P. (2005). Xanthone and Sesquiterpene Derivates from the Fruits of *Garcinia scortechinii*. *J.Nat.Prod*, 68 , 1010-1017.
- Taher, A. (2003). *Peran Fitoestrogen Kedelai Sebagai Antioksidan dalam Penanggulangan Aterosklerosis. Tesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Thaipong., Boonprakob, K., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity From Guava Fruit Extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 19 , 669-675.
- Venkataraman, K. (1976). Recent Work On Some Natural Phenolic Pigments. *11* , 571-1586.
- Vieira, L.M.M., Kijjoa A., Silva A.M.S., Mondranondra I.O. (2004). Lanostanes and Friedolanostanes from The bark of *Garcinia speciosa*. *Phytochemistry*, Vol , 393-398.
- Wang, C. C., Chu, C. Y., Chu, K. O., Choy, K. W., Khaw, K. S., Rogers, M. S., Pang, C. P. (2004). Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma. *Clinical Chemistry Vol. 50 (5)* , 952-954.

## BIODATA PENULIS



Penulis bernama Uchik Nur Hidayatika. Lahir di kota Madiun, pada tanggal 10 Oktober 1993. Merupakan anak pertama dari tiga bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan di TK Dharmawanita Warukkalong. Lulus dari TK pada tahun 1999, penulis melanjutkan pendidikan di SDN Gading II. Kemudian menempuh pendidikan di SMPN 6 Surabaya. Lulus dari SMP penulis menyelesaikan pendidikan menengah atas di SMAN 4 Surabaya. Pada tahun 2011, penulis diterima di ITS melalui jalur SNMPTN Tulis di Jurusan Kimia FMIPA ITS dan terdaftar dengan NRP. 1411100069. Dalam menyelesaikan tugas akhirnya penulis mengambil bidang Kimia Organik Bahan Alam. Selama menyelesaikan pendidikan di ITS, penulis juga aktif dalam organisasi mahasiswa. Diantaranya yaitu sebagai staf Departemen Kesejahteraan Mahasiswa Himpunan Mahasiswa Kimia 2012/2013, sekretaris Departemen Kesejahteraan Mahasiswa Himpunan Mahasiswa Kimia 2013/2014, Tim Pemandu FMIPA ITS. Penulis dapat dihubungi di [uchik.n.h@gmail.com](mailto:uchik.n.h@gmail.com).